

Caracterização de blendas a base de cimento de aluminato de cálcio quanto ao comportamento em cultivo celular (Characterization of blends based on calcium aluminate cement in cell culture)

I.R. de Oliveira¹, L.M.S. Castro-Raucci², P.T. de Oliveira², V.C. Pandolfelli³

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba
São José dos Campos - SP

²Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto - SP

³Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos
São Carlos – SP
ivonero@univap.br

Resumo

Cimento de aluminato de cálcio (CAC) puro ou suas blendas vem sendo estudadas para reparo ósseo. A caracterização in vitro é fundamental para a análise inicial da biocompatibilidade e é usada para medir as respostas celulares. Dentro deste contexto, blendas a base de CAC foram caracterizadas quanto ao comportamento em cultivo celular de osteoblastos (UMR-106) comparado ao PMMA. Para a análise da citotoxicidade, a morfologia celular e a genotoxicidade foram avaliadas. A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada quantitativamente para verificar a diferenciação em célula óssea. O conteúdo de proteína total foi avaliado para verificar a atividade celular. Foram observadas células aderidas distribuídas por todo o substrato em todos os grupos. Após 3 dias, observou-se maior atividade de ALP para o controle, alumina e PMMA. Valores similares de conteúdo de proteína total foram verificados em todos os grupos avaliados. Após 5 dias, os maiores valores de atividade de ALP foram observados nos grupos CAC e quitosana e maior conteúdo de proteína total para controle, CAC, hidroxiapatita e quitosana. Conclui-se que as blendas mostraram-se promissoras à aplicação no reparo ósseo.

Palavras-chave: blendas de CAC, morfologia celular, genotoxicidade, ALP, proteína total.

Abstract

Plain calcium aluminate cement (CAC) or its blends have been studied for bone repair. In vitro characterization is critical for initial biocompatibility analysis and is used to measure cell responses. Within this context, CAC-based blends were characterized for behavior in osteoblast cell culture (UMR-106) compared to PMMA. For cytotoxicity analysis, cell morphology and genotoxicity were evaluated. Also, at 3 and 5 days, alkaline phosphatase activity (ALP) was quantitatively evaluated to verify differentiation in bone cell. The total protein content was evaluated to verify cell activity. Adhered cells distributed throughout the substrate were observed in all groups. After 3 days, higher ALP activity was observed for the control, alumina and PMMA. Similar values of total protein content were found in all groups. After 5 days, the highest values of ALP activity were observed in the CAC and chitosan groups and the highest total protein content for control, CAC, hydroxyapatite and chitosan. It was concluded that the blends were promising for application in bone repair.

Keywords: CAC-blends, cell morphology, genotoxicity, ALP, total protein.

INTRODUÇÃO

O biomaterial ainda de maior destaque na fixação de próteses, consolidação de fraturas ou reconstrução de defeitos ósseos é o cimento ósseo, também conhecido como cimento ortopédico, PMMA (polimetilmetacrilato) [1, 2]. Entretanto, cimento de aluminato de cálcio (CAC) puro ou suas blendas vem sendo estudadas nas últimas décadas para uso em reparo de defeitos ósseos [3-5]. A caracterização *in vitro* é fundamental para a análise inicial da biocompatibilidade e é usada para medir as respostas celulares visando avaliar o nível de segurança do emprego do material *in vivo*.

A análise qualitativa da genotoxicidade dos materiais pode ser avaliada *in vitro* por meio da marcação da forma fosforilada da histona H2AX. Agentes genotóxicos caracterizam-se por possuir atividade biológica capaz de alterar informações codificadas do DNA, podendo resultar na alteração da estrutura ou do conteúdo dos cromossomos (clastogênese) ou da sequência de bases do DNA (mutagênese), e afetar eventos biológicos importantes, como a reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos [6].

A resposta a um dano ao DNA pode ser iniciada frente a uma variedade de sinais de estresse que são encontrados durante processos fisiológicos ou em resposta a fatores exógenos [7]. Sabe-se que a exposição a agentes genotóxicos promove quebras de fita dupla (DSBs) que resultam rapidamente na fosforilação da histona H2A variante H2AX. Como a fosforilação de H2AX em Ser 139 (γ H2AX) é abundante, rápida e se correlaciona bem com cada DSB, é o marcador mais sensível que pode ser usado para examinar o dano ao DNA produzido e o subsequente reparo da lesão do DNA [8].

As medidas da atividade da fosfatase alcalina (ALP) são importantes para avaliar o dano celular e o potencial de ação biológica dos materiais. ALP é uma enzima hidrolase encontrada nas células. No método de coloração com fosfatase alcalina, a enzima hidrolisa ésteres de naftol fosfato resultando em fenóis e fosfatos. Os fenóis ligam-se a sais de diazônio incolores produzindo corantes azoicos insolúveis e coloridos (vermelho vivo) [9].

A fosfatase alcalina é um marcador da diferenciação osteoblástica e, quando a atividade dessa enzima ocorre em todas as membranas celulares, ela é encontrada em maiores quantidades nas células que mineralizam sua matriz, como os osteoblastos [10]. A atividade ALP de uma composição específica pode indicar a sua capacidade de induzir a mineralização. No entanto no estudo [9], relataram que o papel da fosfatase alcalina não é claro devido à complexidade do processo de extração e solubilização dessa enzima presente no tecido ósseo,

e esse processo pode alterar sua estrutura, sua atividade catalítica e outras propriedades relacionadas à sua função.

Dentro deste contexto o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização de blendas de CAC (alumina, hidroxiapatita e quitosana) quanto à citotoxicidade (morfologia celular e a genotoxicidade), diferenciação em célula óssea (atividade de fosfatase alcalina) e atividade celular (conteúdo de proteína total), comparado ao PMMA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente o cimento de aluminato de cálcio (CAC) foi misturado a seco com dispersante Castament FS60 (Bayer, 0,6%-p) e plastificante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth, 2,8%-p) em moinho de bolas durante 1 hora produzindo a amostra CACH. A seguir diferentes compostos foram adicionados e homogeneizados durante 1 hora com auxílio de moinho de bolas produzindo-se as seguintes blendas: 4%-p de alumina ou hidroxiapatita e 1%-p de quitosana.

Essas blendas foram usadas na preparação de suspensões aquosas (80%-p de sólidos) com as quais foram preparadas amostras cilíndricas (6 mm diâmetro x 2 mm de altura). Amostras de PMMA (Bio mecânica) foram preparadas seguindo recomendações do fabricante. As amostras após a moldagem foram mantidas a 37 °C em uma estufa em ambiente saturado durante 24 horas (cura). Após a cura, as amostras foram esterilizadas a seco em estufa a 110 °C por 24 horas, seguido de tratamento em fluxo (UV) durante 20 minutos.

Foram utilizadas células da linhagem osteoblástica de ratos (UMR-106, American Type Cell Collection – ATCC). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ (Corning Inc. NY, EUA) com 20 mL de meio de cultura D-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen). Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM (Gibco, Gran Island, NY, EUA) e tripsina a 0,25% (Gibco), plaqueadas na densidade de 20.000 células/cm² diretamente nos poços de placas de poliestireno e deixadas aderir por 24 horas previamente à exposição às amostras dos cimentos.

Especificamente para a análise da morfologia, as células foram plaqueadas sobre lamínulas de Thermanox (Nunc Inc., Naperville, IL, EUA). Após a adesão, as culturas foram

expostas às amostras dos cimentos, posicionadas sobre insertos de policarbonato com poro de 3 μm (Greiner) e cultivadas com 1 mL de meio osteogênico, composto pelo meio de expansão acrescido de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico e 7 mM ácido ascórbico. Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada 2-3 dias.

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. Caso contrário, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos dois experimentos distintos, com ensaios realizados em triplicata.

Após 48 horas de exposição, as células foram fixadas por 10 min à temperatura ambiente (TA) em paraformaldeído a 4 % em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB). Após lavagem em PB, as culturas foram processadas para imunofluorescência indireta. As culturas foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5 % em PB por 10 min [11]. Em seguida, foi realizado o bloqueio com leite desnatado a 5 % em PB por 30 min. Anticorpo primário para a forma fosforilada da histona H2AX (1:200, Santa Cruz, EUA), seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha, 1:200, Molecular Probes). Foi utilizada faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), para visualização do citoesqueleto de actina. Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min em TA. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares, marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min. As lamínulas de Thermanox® (Nunc Inc.) foram fixadas em lâminas de vidro e, após a montagem de lamínula de vidro (Fisher Scientific) com meio de montagem anti-fade (Vectashield) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas em microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB (Leica, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera digital Leica DC 300F.

Aos 3 e 5 dias, foi avaliada a atividade de ALP por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Para isso foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Inicialmente, as proteínas foram

extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1 % (Sigma) por 30 min. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/mL, pH 10,1. No tubo padrão foi acrescentado 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados, em cada tubo teste, 50 µL de lisado de células de cada poço. Os tubos foram mantidos a 37 °C por 10 min. Após esse período, 2 mL do reagente de cor (Na₂CO₃ 0,09 µmol/mL e NaOH 0,25 µmol/mL) foram adicionados em todos os tubos (branco, padrão e testes) e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (590 nm; µQuanti, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). A atividade de ALP, em µmol de timoftaleína/h/mL, foi calculada a partir da medida do tubo padrão e foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. Para isso, as proteínas extraídas com lauril sulfato de sódio a 0,1 % (Sigma) foram misturadas com solução de Lowry (Sigma), na proporção 1:1, por 20 min em TA. O extrato foi diluído em reagente de fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma) por 30 min à TA. A absorbância foi avaliada a 680 nm utilizando espectrofotômetro (µQuanti). O conteúdo de proteína total foi então calculado por meio de curva padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 48 horas de exposição, foram observadas células aderidas distribuídas por todo o substrato em todos os grupos experimentais avaliados. Contudo, culturas expostas às amostras dos cimentos exibiram áreas de menor densidade celular em regiões de maior proximidade com as amostras dos materiais (Figura 1) e a presença de núcleos picnóticos, particularmente evidentes nos grupos 4%p hidroxiapatita e 4%p alumina. Nesses núcleos a cromatina está extremamente condensada devido a um processo patológico. A picnose (condensação da cromatina nuclear) é um processo que indica a apoptose do tecido.

A análise qualitativa da genotoxicidade dos cimentos, por meio da marcação da forma fosforilada da histona H2AX pode ser observada na Figura 2. A partir da imunofluorescência indireta, pode-se observar marcação positiva para a forma fosforilada da histona H2AX tanto em células expostas às diferentes blendas de CAC, como também naquelas dos grupos PMMA e Controle. A semelhança entre os grupos teste e Controle podem indicar que a expressão de γH2AX observada nessas culturas pode representar o nível constitutivo da expressão de γH2AX em células vivas, promovido por danos ao DNA resultantes de agentes oxidantes endógenos gerados durante a respiração celular [12].

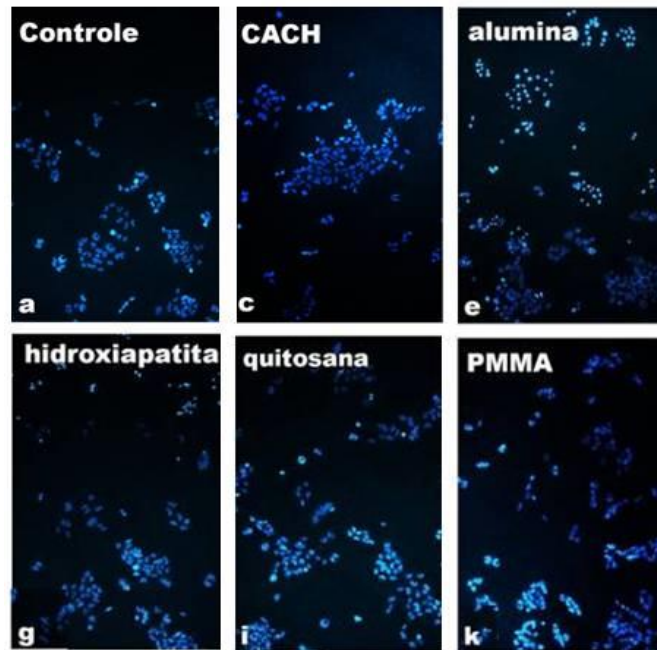


Figura 1: Epifluorescência de culturas de osteoblastos dos seguintes grupos: (a) Controle, (c) CACH, (e) alumina, (g) hidroxiapatita, (i) quitosana e (k) PMMA no período de 48 horas. Fluorescência azul indica os núcleos celulares. Barra de escala = 200 μ m (a, c, e, g, i, k).

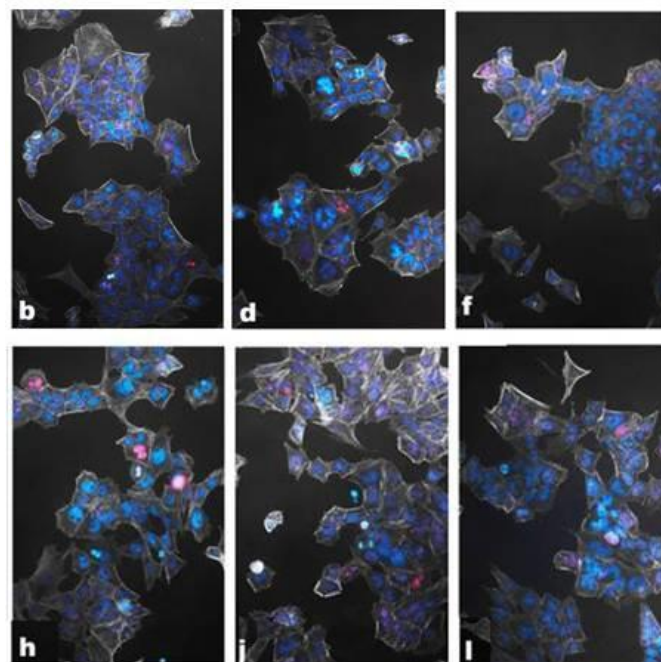


Figura 2: Fluorescência vermelha e branca pálida indica, respectivamente, histona H2AX fosforilada e o citoesqueleto de actina (b, d, f, h, j, l), respectivamente as amostras da figura 1. Barra de escala = 100 μ m (b, d, f, h, j, l).

A atividade de fosfatase alcalina para verificar a diferenciação em célula óssea foi determinada após 3 dias de cultura celular, nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total. Neste período observou-se maior atividade de fosfatase alcalina para os grupos Controle e 4%p alumina, seguidos pelo grupo PMMA (ANOVA One Way, $p < 0,05$; Figura 3a). Não foram observadas diferenças significantes para as demais composições ($p > 0,05$).

Após 5 dias, os maiores valores de atividade de ALP foram observados nos grupos CACH e 1%p quitosana (ANOVA One Way, $p < 0,05$; Figura 3b). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para as demais blendas ($p > 0,05$).

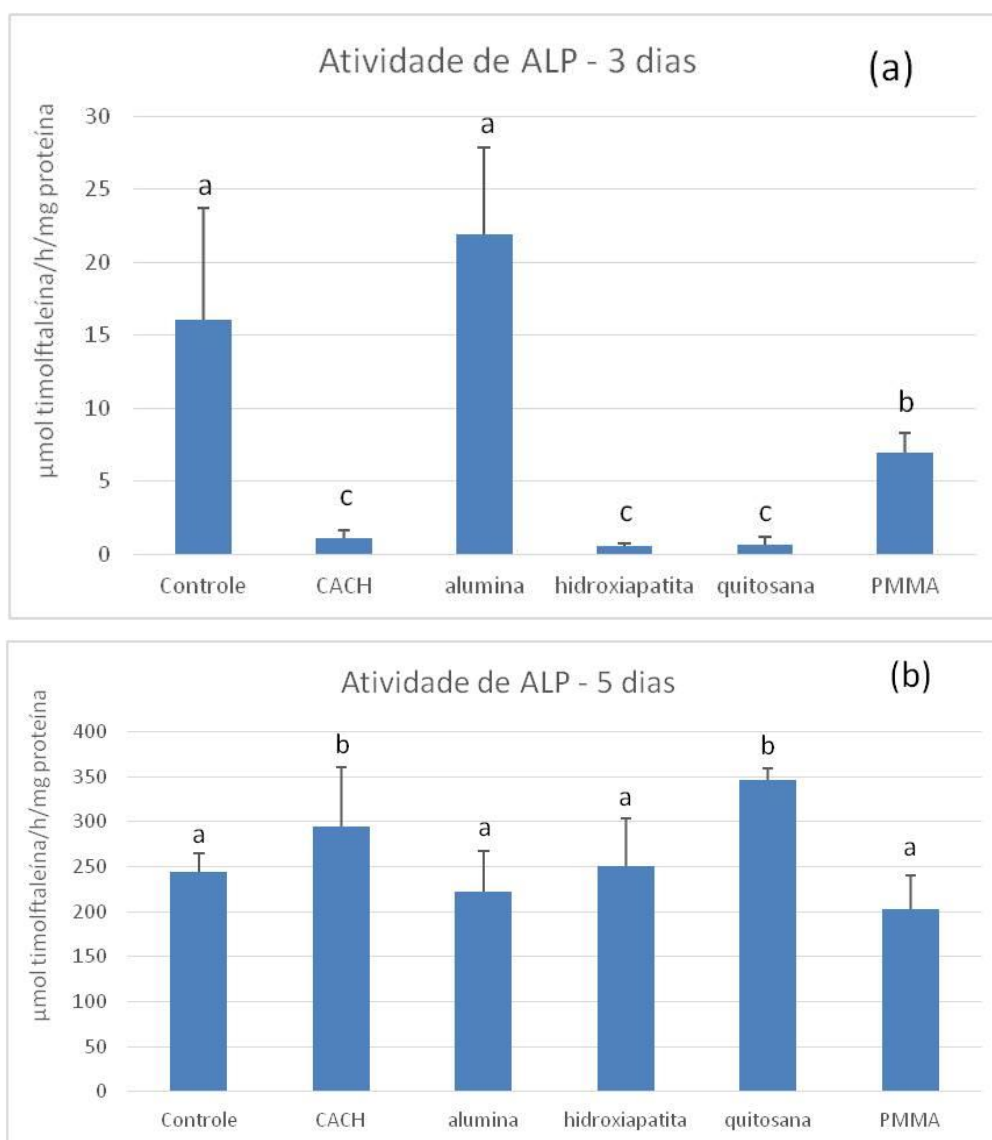


Figura 3: Atividade de fosfatase alcalina em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por (a) 3 ou (b) 5 dias. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

O conteúdo de proteína total para verificar a atividade celular foi avaliado após 3 dias de cultura. Neste período, foram observados valores similares de conteúdo de proteína total em todos os grupos avaliados (ANOVA One Way, $p > 0,05$; Figura 4a).

Neste mesmo período, observou-se maior conteúdo de proteína total em culturas dos grupos Controle, CACH, 4%p hidroxiapatita e 1%p quitosana (ANOVA One Way, $p < 0,05$; Figura 4b), enquanto que os menores valores para esse parâmetro foram observados nos grupos PMMA e 4% alumina ($p < 0,05$).

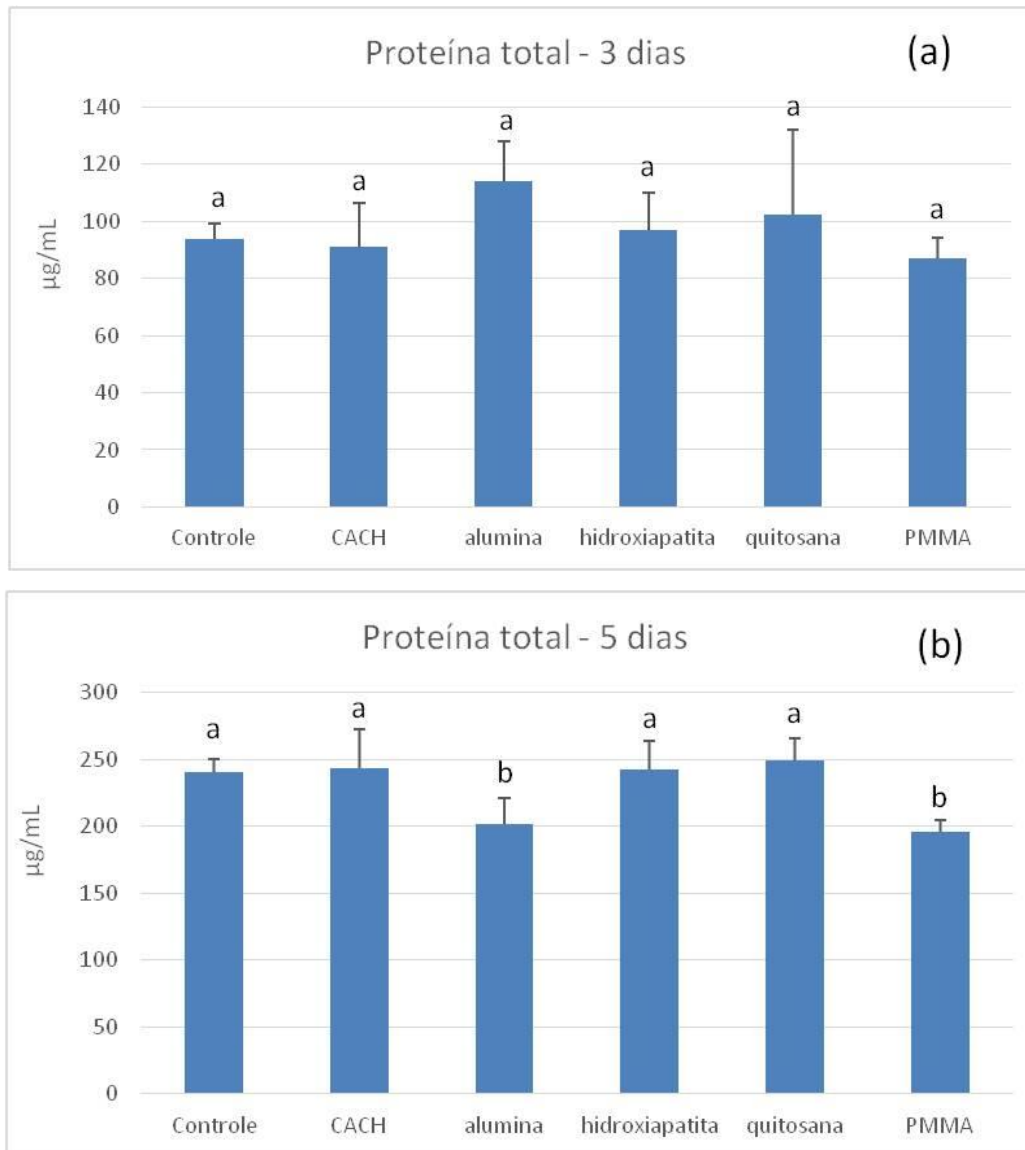


Figura 4: Conteúdo de proteína total em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por (a) ou (b) 5 dias. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A marcação do citoesqueleto de actina com faloidina revelou aspectos morfológicos semelhantes entre as culturas dos diferentes grupos, com células espalhadas, exibindo majoritariamente morfologia poligonal e fibras de estresse do citoesqueleto de actina distribuídas pelo citoplasma e estendendo-se até os limites celulares. A semelhança entre os grupos e Controle indicou que a expressão de γ H2AX observada nessas culturas pode representar o nível constitutivo da expressão de γ H2AX em células vivas, promovido por danos ao DNA resultantes de agentes oxidantes endógenos gerados durante a respiração celular. Maior atividade de fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total foram verificados para todos os grupos após 5 dias quando comparado a 3 dias de exposição.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapesp #2016/15032-3 e CNPq #301665/2015-0 pelo apoio a esta pesquisa, bem como a Imerys Aluminates (França), a Vanderbilt Minerals (EUA) e BASF (Alemanha) por fornecer gentilmente amostras de CAC e aditivos.

REFERÊNCIAS

- [1] R. L. Oréfice, M. M. Pereira, H. S. Mansur, Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Editora Cultura Médica (2006).
- [2] H. Engqvist, T. Persson, J. Loof, A. Faris, L. Hermansson, Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. Trends Biomaterial Artif. Organs. 21, 2 (2008) 98-106.
- [3] R. M. Parreira, T. L. Andrade, A. P. Luz, V. C. Pandolfelli, I. R. Oliveira, Calcium aluminate cement-based compositions for biomaterial applications. Ceramics International 42 (2016) 11732-11738.
- [4] I. R. Oliveira, L. J. Raniero, V. M. C. Leite, L. M. S. Castro-Raucci, P. T. De Oliveira, V. C. Pandolfelli, In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. Ceramics International 43 (2017) 10071-10079.
- [5] I. R. Oliveira, G. V. Vieira, K. W. Dos Santos, L. J. Raniero, L. M. S. Castro-Raucci, P. T. De Oliveira, C. I. Fornari, V. C. Pandolfelli, Improving the radiopacity of calcium aluminate cement based blends. Materials Research 21, 2 (2018) 1-11.
- [6] D. A. Ribeiro, M. M. Sugui, M. A. Matsumoto, M. A. Duarte, M. E. Marques, D. M. Salvadori, Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology 101, 2 (2006) 258-261.
- [7] R. F. Lee, S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat Res. 544, 1 (2003) 43-64.
- [8] A. Sharma, K. Singh, A. Almasan, Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. Methods Mol Biol. 920 (2012) 613-626.

- [9] A. Simão, M. Beloti, A. Rosa, P. Oliveira, J. Granjeiro, J. Pizauro, Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell biology International*, 31 (2007) 1405-1413.
- [10] J. Lincks, B. Boyan, C. Blanchard, C. Lohmann, Y. Liu, D. Cochran, Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19 (1998) 2219-2232.
- [11] P. T. De Oliveira, A. Nanci, Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 25, 3 (2004) 403-413.
- [12] T. Tanaka, H. D. Halicka, X. Huang, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* 5 (2006) 1940-1945.