

CARACTERIZAÇÃO DE BLENDA A BASE DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO QUANTO A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica

Ivone R. de Oliveira¹, Larissa M.S. Castro-Raucci², Ana M. Barbosa¹, Isabela S. Gonçalves¹,
Gabriela P. do Carmo¹, Paulo T. de Oliveira²

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
ivonero@univap.br

Resumo. A caracterização *in vitro* de biomateriais é usada para medir as respostas celulares visando avaliar o nível de segurança do seu emprego *in vivo*. Blendas a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) foram caracterizadas quanto a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica em comparação ao produto comercial (PMMA). O desenvolvimento do fenótipo osteogênico de células derivadas de calvária de ratos foi avaliado pela expressão gênica de: 1) *Runx2*, fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica, 2) fosfatase alcalina (ALP), enzima importante para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular; 3) osteopontina (OPN), proteína não-colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização; 4) sialoproteína óssea (BSP), proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita; e 5) osteocalcina (OC), proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros. A blenda CAC-1%-p colágeno apresentou superior *RUNX-2*, ALP, BSP e OC.

Palavras-chave: Blendas de CAC, *In vitro*, Expressão gênica, Osteoblastos.

1. INTRODUÇÃO

O cimento ósseo é um material composto pela mistura de um polímero (pó) e um monômero (líquido), conhecidos como polimetilmetacrilato (PMMA), os quais são unidos pelo processo de polimerização. O PMMA apresenta excelentes propriedades mecânicas comparadas a outros polímeros [Oréface, 2006; Engqvist, 2008]. Entretanto, PMMA apresenta algumas deficiências com relação a propriedades de manuseio e biocompatibilidade. Suas reações são exotérmicas gerando excesso de calor no tecido circundante o que pode causar danos ao tecido, não é injetado diretamente após a mistura devido a sua consistência muito líquida e cheiro forte. Além disso, pode ocorrer necrose química atribuída à liberação de monômero não reagido. Ainda, depois de implantado não induz qualquer tipo de remodelação óssea, pois não é um material bioativo [Alves, 2006].

Por outro lado, o uso de cimento de aluminato de cálcio (CAC) como biomaterial tem sido motivado na ortopedia devido a suas características inerentes como alta viscosidade, permitindo injeção direta após a mistura, baixa reação exotérmica e alta biocompatibilidade [Oréface, 2006; Burger, 2010].

Além disso, blendas de CAC contendo 4 %-p dos diferentes compostos, com exceção de colágeno e quitosana, resultaram em amostras com alta resistência mecânica (similar ao PMMA). As composições se mostraram bioativas quando em contato com fluido corporal simulado. Resultados preliminares *in vitro* também avaliaram a viabilidade de células osteoblásticas quando em contato com as blendas apontando resultados promissores

principalmente para as amostras contendo zircônia, colágeno e óxido de zinco [Castro-Raucci, 2017].

Dentro deste contexto, o presente projeto propôs a continuação desses estudos por meio de ensaios *in vitro* que ainda se fazem necessários para avaliação quanto à eficiência de composições a base de CAC no reparo e regeneração do tecido ósseo. Blendas a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) foram caracterizadas quanto a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica em comparação ao produto comercial (PMMA).

O desenvolvimento do fenótipo osteogênico de células derivadas de calvária de ratos foi avaliado pela expressão gênica de: 1) Runx2, fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica [Marie, 2008], 2) fosfatase alcalina (ALP), enzima importante para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular; 3) osteopontina (OPN), proteína não-colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização [Goldberg, 1995]; 4) sialoproteína óssea (BSP), proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita [Hunter, 1993]; e 5) osteocalcina (OC), proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros [Ducy, 1996].

2. 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. 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, 4%-p de hidroxiapatita e 1%-p de colágeno.

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.

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 µg/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 CO₂ 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 3 dias de exposição, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à TA, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA).

A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Para a reação de Real-time PCR, foram utilizados o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), e o aparelho StepOne Plus (ThermoFisher). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 µL, contendo 12,5 ng de cDNA. As reações de amplificação consistiram em 2 min a 95°C e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60 °C.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

O desenvolvimento do fenótipo osteogênico de células derivadas de calvária de ratos foi avaliado pela expressão gênica de: 1) Runx2, 2) fosfatase alcalina (ALP), 3) osteopontina (OPN), 4) sialoproteína óssea (BSP) e 5) osteocalcina (OC).

Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As sequências dos *primers* selecionados para este estudo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real

		CGT ATT TCA GAT GAT GAC ACT
RUNX2	<i>foward</i>	GCC
RUNX2	<i>reverse</i>	AAA TGC CTG GGA ACT GCC TG
ALP	<i>foward</i>	TAC TGC TGA TCA CTC CCA CG
ALP	<i>reverse</i>	TAC TGC TGA TCA CTC CCA CG
OPN	<i>foward</i>	GAA GCC TGA CCC ATC TCA GAA GTT GCT TGG AAG AGT TTC TTG
OPN	<i>reverse</i>	CTT
BSP	<i>foward</i>	GAC TGC TTT AAT CTT GCT CTG CAT
BSP	<i>reverse</i>	GTA GCG TGG CCG GTA CTT AAA
OC	<i>foward</i>	GCA TTC TGC CTC TCT GAC CTG CCG GAG TCT ATT CAC CAC CTT
OC	<i>reverse</i>	AC
GAPDH	<i>foward</i>	GAC AAC TTT GGC ATC GTG GAA

GAPDH reverse AGG GAT GAT GTT CTG GGC TG

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 3 dias, a expressão de RUNX-2 foi superior nos grupos Controle, PMMA, colágeno, sendo os menores valores obtidos para 4%p hidroxiapatita e 4%p alumina (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; Figura 1). Os grupos Controle e 1%p colágeno exibiram os maiores níveis de expressão gênica para ALP e BSP (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; Figuras 2 e 4). A expressão de OPN foi superior no grupo controle em relação a todos os grupos de cimentos; sendo que, entre estes, os maiores níveis de expressão de OPN foram observados para PMMA, e os menores, para 1%p colágeno (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; Figura 3). Controle, PMMA e 1%p colágeno exibiram os maiores níveis de expressão de OC neste período (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; Figura 5), enquanto que os demais cimentos exibiram valores similares entre si ($p > 0,05$).

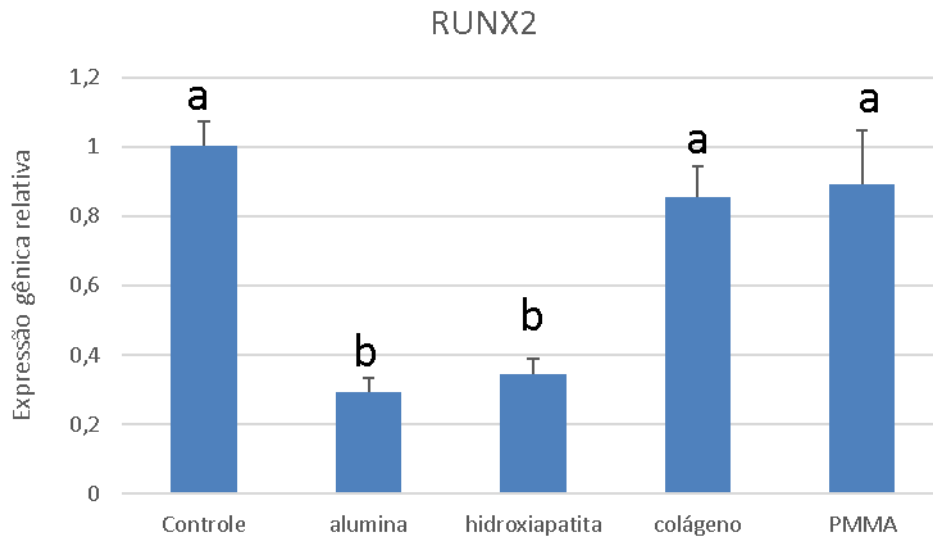


Figura 1: Expressão relativa do gene para o fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2 (RUNX-2) em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por 3 dias. Níveis de expressão do gene-alvo normalizados pelo controle endógeno GAPDH e calibrados pelos valores obtidos no grupo Controle. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

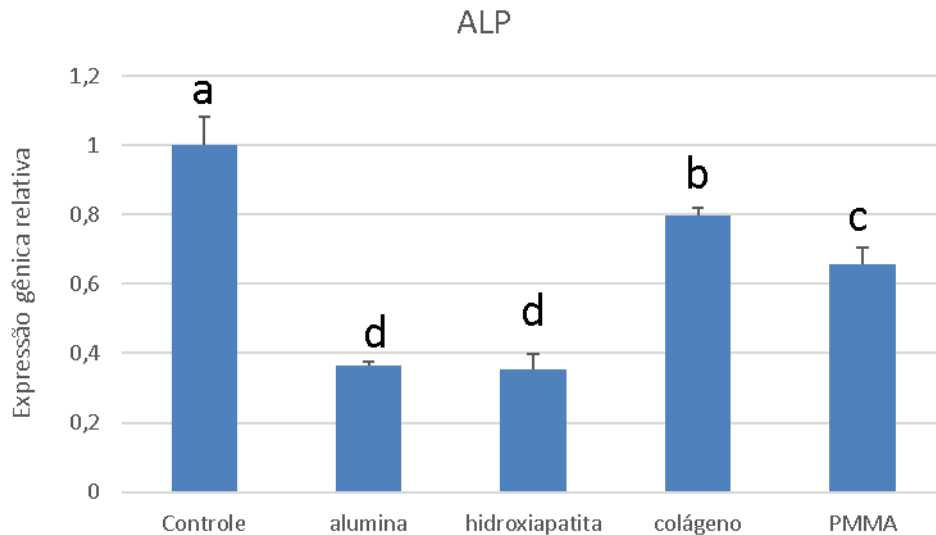


Figura 2: Expressão relativa do gene para fosfatase alcalina (ALP) em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por 3 dias. Níveis de expressão do gene-alvo normalizados pelo controle endógeno GAPDH e calibrados pelos valores obtidos no grupo Controle. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

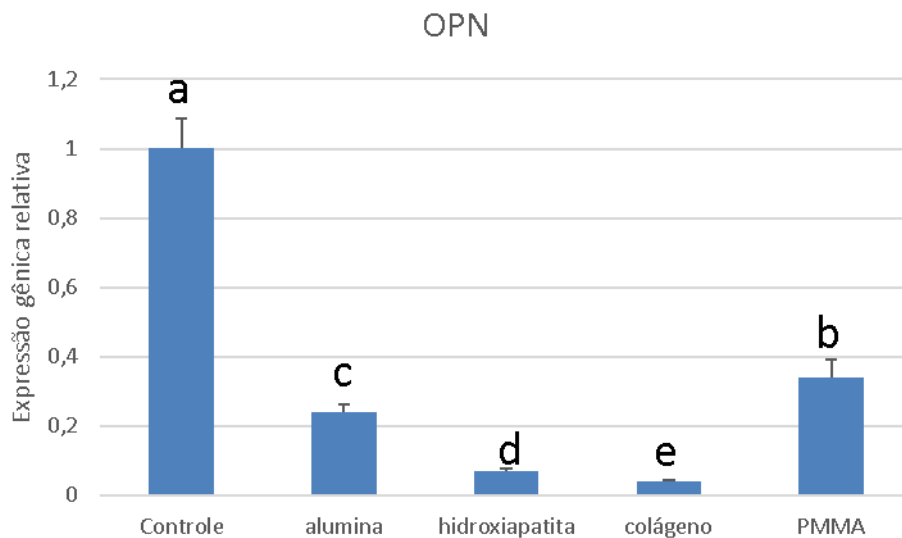


Figura 3: Expressão relativa do gene para osteopontina (OPN) em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por 3 dias. Níveis de expressão do gene-alvo normalizados pelo controle endógeno GAPDH e calibrados pelos valores obtidos no grupo Controle. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

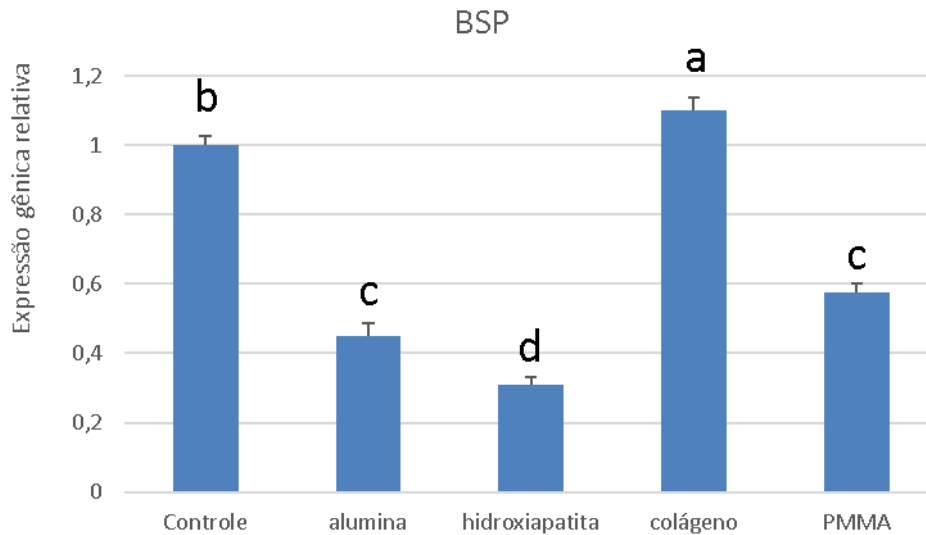


Figura 4: Expressão relativa do gene para sialoproteína óssea (BSP) em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por 3 dias. Níveis de expressão do gene-alvo normalizados pelo controle endógeno GAPDH e calibrados pelos valores obtidos no grupo Controle. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

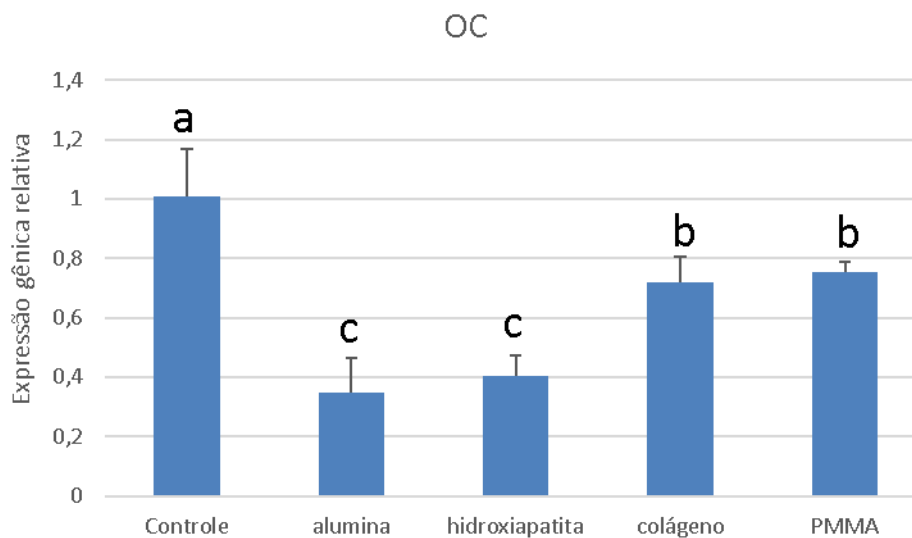


Figura 5: Expressão relativa do gene para osteocalcina (OC) em culturas osteoblásticas expostas ao PMMA e diferentes preparações do cimento CAC, ou crescidas na ausência dos cimentos (Controle) por 3 dias. Níveis de expressão do gene-alvo normalizados pelo controle endógeno GAPDH e calibrados pelos valores obtidos no grupo Controle. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

4. CONCLUSÕES

A blenda CAC-1%-p colágeno mostrou-se a mais promissora para aplicação no reparo e regeneração do tecido ósseo apresentando resultados superiores de fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica

(RUNX-2), enzima importante para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular (ALP), proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita (BSP) e proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros (OC).

Colágeno é um biopolímero que vem ganhando destaque como biomaterial. O aumento da aplicação do colágeno se deve ao seu baixo índice de reações imunológicas e sua capacidade de formar fibras a partir de preparações solúveis, cujas propriedades são similares às encontradas nos tecidos.

CHARACTERIZATION OF CALCIUM ALUMINATE CEMENT-BASED BLENDS FOR GENETIC EXPRESSION OF MARKERS OF OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION

Ivone R. de Oliveira¹, Larissa M.S. Castro-Raucci², Ana M. Barbosa¹, Isabela S. Gonçalves¹,
Gabriela P. do Carmo¹, Paulo T. de Oliveira²

¹Research and Development Institute - University of Vale do Paraíba
Sao Jose dos Campos – SP

²Ribeirão Preto Dental School - University of São Paulo
Ribeirão Preto - SPivonero@univap.br

Abstract. *In vitro* characterization of biomaterials is used to measure cellular responses to assess the safety level of their use in vivo. Calcium aluminate cement based (CAC) blends were characterized for the gene expression of osteoblast differentiation markers compared to the commercial product (PMMA). The development of the osteogenic phenotype of rat calvary-derived cells was evaluated by the gene expression of: 1) Runx2, a transcription factor indispensable to the compromise of mesenchymal cells with the osteoblastic lineage, 2) alkaline phosphatase (ALP), an important enzyme for availability of phosphate for the extracellular matrix mineralization process; 3) osteopontin (OPN), non-collagen matrix protein related to cell adhesion processes and control of apatite crystal growth during the mineralization process; 4) bone sialoprotein (BSP), a non-collagen matrix protein that participates in the nucleation of the first apatite crystals; and 5) osteocalcin (OC), a non-collagen matrix protein used as a marker of mature osteoblasts. The CAC-1% -p collagen blend showed superior RUNX-2, ALP, BSP and OC.

Keywords: CAC blends, in vitro, gene expression, osteoblasts.

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

Alves, H.L.R., Santos L.A., Bergmann C.P. Influência de aditivos na injetabilidade de cimento ósseo de fosfato tricálcico. Revista Matéria v. 11, p. 324-331, 2006.

- Burger, C. P. Calcium Aluminate Cement - Use in bone defects induced in the femurs of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), Dissertation (Masters), Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, 2010.
- Castro-Raucci, L.M.S., Teixeira, L.N., Oliveira, I.R., Raucci-Neto, W., Jacobovitz, M., Rosa, A.L., Oliveira, P.T. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. *International Endodontic Journal*, v. 50, p. 771-779, 2017.
- Ducy, P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, v. 382, n. 6590, p. 448-52, 1996.
- Engqvist, H.; Persson, T.; Loof, J.; Faris, A.; Hermansson, L. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. *Trends Biomaterial Artif. Organs*, v. 21, n. 2, p. 98-106, 2008.
- Goldberg, H.A., Hunter, G.K. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 760, p. 305-308, 1995.
- Hunter, G.K., Goldberg, H.A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 18, p. 8562-8565, 1993.
- Marie, P.J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*, v. 473, n. 2, p. 98-105, 2008.
- Oréface, R.L., Pereira, M.M., Mansur, H.S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Editora Cultura Médica (2006).