

Biocompatibilidade e mineralização de células osteoblásticas em contato com nióbio

Paulo Henrique Molin, phmolin@gmail.com
Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, hsaraujo@ufscar.br
João Manuel Domingos de Almeida Rollo, tfase@sc.usp.br

Resumo. O nióbio possui potencial para ser um metal de grande aplicabilidade tanto na engenharia como na área médica; porém a literatura médica a respeito do comportamento deste material é escassa. Para que o elemento nióbio possa ser utilizado como material de implante se faz necessário avaliá-lo quanto a sua biocompatibilidade e mineralização. Para tanto é importante compreender os eventos celulares e moleculares que ocorrem na interface material-célula. Será avaliada a biocompatibilidade e mineralização do material biológico em contato com o elemento nióbio via técnicas laboratoriais de AlamarBlue e coloração de Alizarin Red. O metal nióbio pode ser classificado como metal bioinerte pela sua biocompatibilidade e possibilidade a neoformação óssea em sua superfície.

Palavras chave: Biomaterial, biocompatibilidade, osteogênese, nióbio puro, material de implante

1. INTRODUÇÃO

O nióbio (Nb), também utilizado como elemento de liga na fabricação de aços especiais, é um metal resistente à corrosão, a altas temperaturas e leve quando comparado com os outros metais refratários (Acchar et. al., 2000). Metal em abundância no Brasil, sendo de fundamental importância o estudo deste elemento para a indústria metal mecânica de alta tecnologia. O Brasil detém 98% das reservas naturais conhecidas mundialmente, concentrando nos estados Minas Gerais (73,11%) Amazonas (25,42%) e Goiás (1,47%), mantendo a liderança na oferta de nióbio no cenário mundial, atingindo uma participação de 92,4% da produção mundial deste metal.

O nióbio possui potencial para ser um metal de grande aplicabilidade tanto na engenharia como na área médica; porém a literatura médica a respeito do comportamento deste material em contato com o meio tecidual biológico é escassa.

A biocompatibilidade é um termo que abrange vários aspectos do material, incluindo desde suas propriedades físicas, mecânicas e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando injúrias na função biológica (Schmalz, 2002).

Os materiais para implantes são classificados segundo a sua biocompatibilidade: biotolerantes, bioinertes e bioativos (Bandyopadhyay e Bose, 2013). Os metais biotolerantes são aqueles que não são necessariamente rejeitados quando implantados em tecido vivo, mas são rodeados por tecido conjuntivo fibroso na forma de cápsula (com exemplo, metais como ouro, liga de cromo-cobalto, aço inoxidável F132 e zircônio). Os bioinertes são metais que permitem aposição de osso em sua superfície, levando a uma osteogênese de contato (com exemplo, titânio comercialmente puro e ligas de titânio). Os materiais bioativos também permitem a formação de osso em sua superfície através de trocas iônicas, levando a formação de uma interface com ligações químicas com o material (com exemplo, hidroxiapatita, fosfato tricálcico e fluorapatita). Os implantes metálicos bioinertes e bioativos também são chamados de osteocondutores, significando que eles podem atuar como scaffold, permitindo o crescimento ósseo em sua superfície (Bombonato-Prado et. al., 2009). Sendo assim, é de fundamental importância avaliar a classificação do elemento nióbio puro segundo sua biocompatibilidade.

A biocompatibilidade dos materiais é evidenciada pelo comportamento das células quando em contato com a superfície do implante e pela adesão celular a este. A adesão e o espalhamento pertencem à primeira fase da interação célula/material e a qualidade desta interação influenciará a capacidade celular de se proliferar e diferenciar em contato com o implante (Anselme, 2000).

A viabilidade celular está intimamente relacionada à biocompatibilidade. Muitos estudos utilizam a técnica de AlamarBlue para determinar a atividade celular [28].

A resazurina, conhecido comercialmente por Alamar Blue, serve como indicador de oxidação-redução. A forma oxidada do Alamar Blue apresenta-se não fluorescente com coloração azul. Este composto pode ser reduzido intracelularmente a resofurin, composto de coloração rosa e fluorescente, permitindo uma avaliação da atividade celular metabólica por leitura fluorescente. Assim, a análise da alteração por espectrometria do Alamar Blue é um método rápido, sensível e não citotóxico para analisar a viabilidade celular, contribuindo para a investigação de mecanismos de proliferação e toxicidade em modelos celulares (Springer et. al., 2014).

Apesar de o tecido ósseo apresentar alto potencial de regeneração, este aspecto pode não se apresentar em defeitos de grandes dimensões. Nestes casos é necessária a utilização de materiais que favorecem a regeneração óssea (Gleizal e Beziat, 2007).

Os biomateriais podem promover a neoformação óssea através de três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é a formação de osso novo proveniente de células osteocompetentes (Carvalho et. al. 2002). A osteoindução se refere à capacidade de muitas substâncias químicas normais do corpo de estimularem células-tronco primitivas ou células ósseas imaturas a crescerem e amadurecerem em células osteoblásticas, células formadoras de osso. Normalmente estes sinais são moléculas denominadas de “fatores de crescimento peptídeos” ou “citocinas”, que são produzidas pelas células ósseas e outras células locais. Já osteocondução se refere à capacidade de alguns materiais servirem de armação sobre a qual células ósseas podem se fixar, migrar, crescer e se dividir (Magalhães et. al., 2010).

O ideal seria possuir um material que pudesse induzir os três mecanismos de neoformação. Com isso, permitiria uma osteointegração, ou seja, formação de osso na superfície do material, integrando o material com o osso.

Para quantificar os três tipos de mecanismos de neoformação óssea é necessário fazer testes de expressão gênica para as citocinas, assim como, testes de mineralização para a formação inorgânica do osso. A análise qualitativa da mineralização é realizada pela marcação com Alizarin Red-S (Sigma), este corante, derivado de antraquinona, pode ser utilizada para identificar depósitos de cálcio em seções de tecidos e células em cultura *in vitro* (Kwon et. al., 2014). Consequentemente, é utilizado para determinar a osteocalcificação.

2. OBJETIVO

Avaliar a biocompatibilidade e o potencial de mineralização do elemento metálico nióbio em contato direto com células osteoblásticas *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos nióbio puro de composição em porcentagem por peso de 97,47% de Nb, 1,54% de Si, 0,42% de Eu, 0,29% de Ho, 0,16% de Re, 0,08% de Ni e 0,03% de Fe, de formato cilíndrico com as dimensões 14x2mm, fornecidos pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM).

3.1- Cultura celular

Utilizamos a linhagem celular de células percursoras de osteoblastos de camundongos, MCT3-E1, fornecidas pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar sob coordenação da Professora Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo. As células foram suplementadas com meio de cultura α -MEM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de Penicilina-Streptomicina (Gibco); mantidas em estufas à 37°C com 5% de CO₂. Esta linhagem celular não se faz necessário a análise de comitê de ética.

3.2- Viabilidade celular

Foi utilizado o protocolo experimental provido pela *Termo Scientific*, fabricante do Alamar Blue.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, em concentração de 2×10^4 células por poço, sobre pellets de nióbio e em poços sem nióbio direto na placa de poliestireno como comparativo. A viabilidade celular foi analisada no dia 1 (24h), 3, 5 e 7 em cultura por espectrômetro *Spectra MAX Gemini XS* da *Molecular Device*. Utilizamos o programa *Softmaxpro* com leituras de ondas de excitação de 544 nm e emissão de 590 nm.

AlamarBlue foi diluído em uma concentração de 1:9 em meio α -MEM. Adicionamos 600 μ l dessa solução por poço. Após 4 horas de inoculação, retiramos 200 μ l do sobrenadante e colocamos em placas de 96 poços para análise na espectrometria. Baseado com o controle positivo (solução não oxidada) e o controle negativo (solução totalmente oxidada em autoclave) foi possível calcular a viabilidade celular.

Após a leitura do sobrenadante, o meio com solução foi retirado e substituído por meio α -MEM sem AlamarBlue.

3.3- Mineralização celular

Uma solução estéril concentrada de 1,53g de β -Glicerol Fosfato a 1M com 250mg de Ácido α -Ascórbico 2-Fosfato diluídos em 10ml de α -MEM foi preparado; posteriormente diluída em uma proporção de 1:49 em meio α -MEM para estimular a mineralização celular.

Células osteoblásticas foram cultivadas sobre o pellet de nióbio em uma concentração de 2×10^4 células por poço em placas de 24 poços. Foram suplementadas com meio de mineralização durante 21 dias; com troca de meio a cada 2 dias. A cultura foi fixada e desidratada com álcool 70% nos dias 1 (24h), 7, 14 e 21 para análise comparativa. Subsequentemente, foram coradas com Alizarin Red-S a 40mM para visualização do potencial de mineralização no equipamento esteromicroscópio, seguindo o protocolo experimental da Ippei Kanazawa et al (2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Biocompatibilidade do elemento nióbio

Comparando os resultados do experimento *in vitro* de viabilidade celular (figura 1) na presença e ausência de nióbio, ficou evidenciado que não há nenhuma diferença estatística entre os grupos com Nb e sem Nb. Logo podemos concluir que o metal nióbio não é citotóxico, permitindo a sobrevivência e atividade celular.

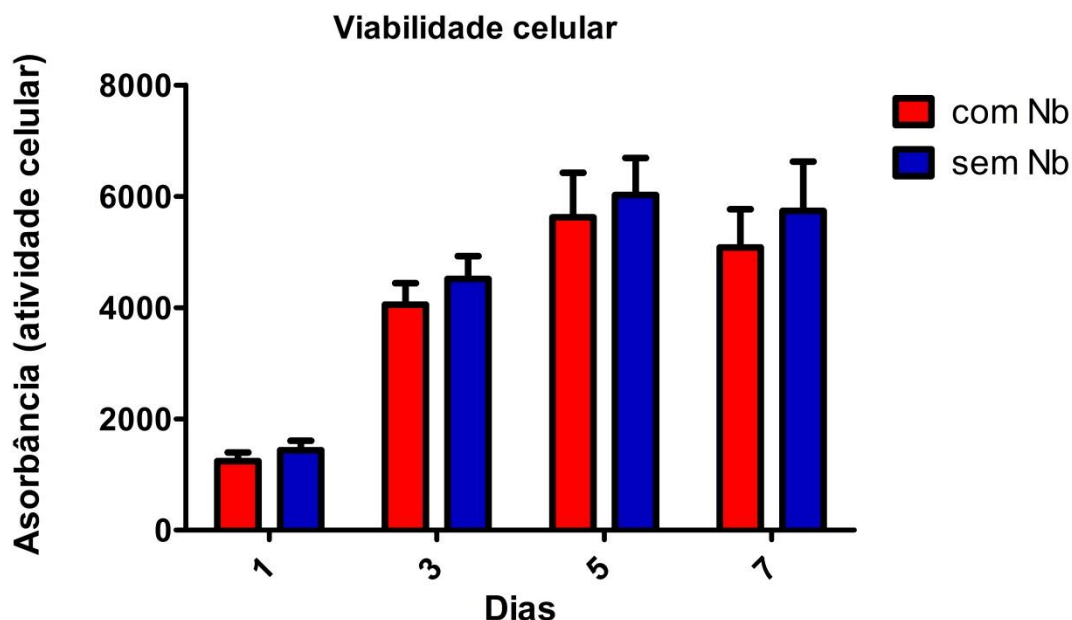


Figura 1- Gráfico da absorbância x dia;

4.2- Mineralização celular

Com base nas imagens obtidas pelo esteromicroscópio (figura 2 e 3), podemos notar que há um aumento da coloração vermelha conforme dia a dia em cultura.

O Alizarin Red-S, conforme previamente descrito, possui função de marcar depósitos de cálcio *in vitro*. Pelas figuras 2 e 3, podemos deduzir que as células osteoblásticas em contato com o nióbio estão ativas e mineralizando o MEC, ou seja, neoformação óssea.

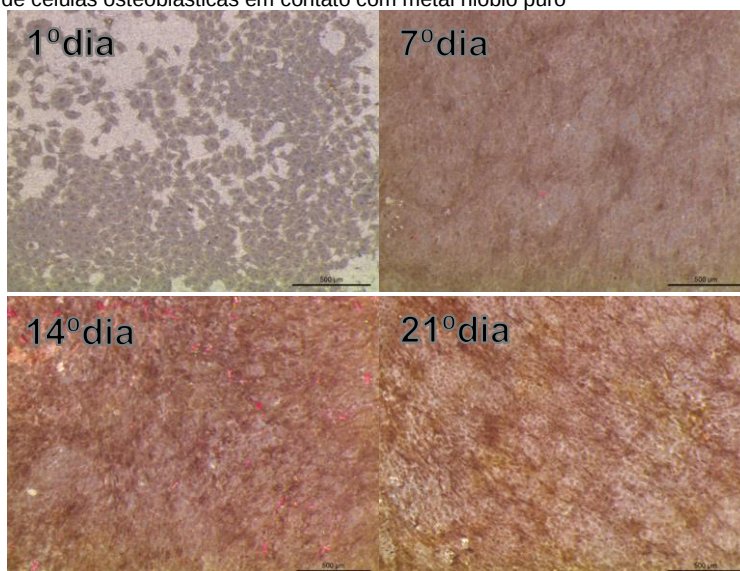


Figura 2 – Imagem do esteromicroscópio nos dias 1, 7, 14 e 21 em cultura com meio de mineralização após a coloração com Alizarin Red; barra de escala de 500µm.

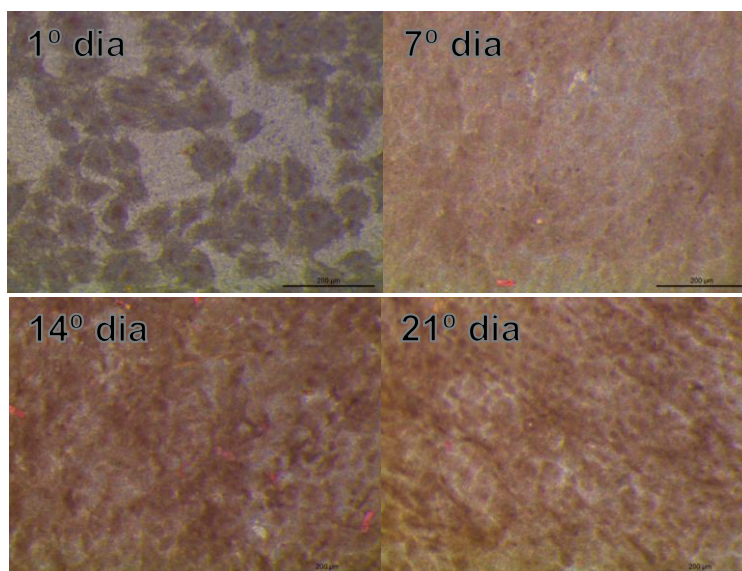


Figura 3- Imagem do esteromicroscópio nos dias 1, 7, 14 e 21 em cultura com meio de mineralização após a coloração com Alizarin Red; barra de escala de 200µm.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir nesta primeira etapa da pesquisa que o metal nióbio é biocompatível e osteocondutor.

A etapa conclusiva é realizar a análise de qPCR para as proteínas de adesão celular, matriz extracelular, moléculas indicadoras de reparo ósseo, marcador de sinalização celular e Bone morphogenetic protein (BMPs). Dados quantitativos da expressão dessas proteínas e moléculas serão analisados para determinar a capacidade de osteogênese, osteocondução e osteoindução das células osteoblásticas em contato com nióbio puro.

6. REFERÊNCIAS

Acchar, W., 2000, “Sintering behaviour of alumina–niobium carbide composites”, Journal of the European Ceramic Society Volume 20, Issue 11, Pages 1765–1769.

- Anselme, K., 2000, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials*; 21(7):667-81.
- Bandyopadhyay, A., 2013, "Characterization of Biomaterials", Editora Newnes.
- Bombonato-Prado, K.F., 2009, "Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials", *J Biomed Mater Res*; 88(2):401-8.
- Carvalho, D.C.L., 2002, "Non-pharmacological treatments in the stimulation of osteogenesis", *Rev Saúde Pública*; 36(5):647-54
- Gleizal, AM., 2007, "Maxillary and mandibular reconstruction using bicortical calvarial bone grafts: a retrospective study of 122 reconstructions in 73 patients.", *Plast Reconstr Surg*; 119(2):542-8;
- Kanazawa, I., 2007, "Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells.", *BMC Cell Biology*, 8:51.
- Kwon, Y.D., 2014, "Magnesium vs. machined surfaced titanium - osteoblast and osteoclast differentiation.", *Jornal Adv Prosthodont*; 6(3):157-64.
- Magalhães, A.H.M., 2010, "Study of Bone Conduction and Osteoinduction Through the Association of Bioceramics and Collagen for Internal Fixation of The Orbit".
- Schmalz, G. J., 2002, "Materials science: biological aspects", *Dent Res*; 81(10):660-3.
- Springer, J.C., 2014, "In vitro dermal and epidermal cellular response to titanium alloy implants fabricated with electron beam melting.", *Med Eng Phys*; 36(10):1367-72.

7. AGRADECIMENTOS

A Capes pelo financiamento desta pesquisa.

A Profa. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar, pela parceria e execução do trabalho.

A todos os envolvidos nos ensaios das amostras nos respectivos laboratórios e universidades.

A Luciana Bueno dos Reis Fernandes por ter me auxiliado e acompanhado na estereomicroscopia do departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da UFSCar.

A Caroline Bellani por ter me auxiliado e acompanhado nos experimentos laboratoriais.

8. ABSTRACT

Niobium has the potential to be a metal with wide applicability in engineering and in the medical field; but the medical literature regarding the behavior of this material is scarce. It is required to evaluate the biocompatibility and mineralization of the pure niobium element if it would be used as an implant material. Therefore, it is important to understand the cellular and molecular events that occur in the material-cell interface. The biocompatibility and mineralization of the organic material in contact with the pure niobium element was evaluated through laboratory techniques such as AlamarBlue and Alizarin Red staining. The niobium metal can be classified as bioinert material for its biocompatibility and it is susceptible for new bone formation on its surface.

9. RESPONSABILIDADE PELAS INFORMAÇÕES

Os autores Paulo Henrique Molin e João Manuel Antônio de Almeida Rollo são os únicos responsáveis pelas informações incluídas neste trabalho.