

DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO EM CERÂMICAS DE FOSFATO TRICÁLCICO DOPADAS COM MAGNÉSIO

K.C. Kai¹, L.S. Ferreira², A. M. S. Pinho³, L.P. Eça³, M.M. Martins² e J. Marchi¹

¹Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Campus Santo André, SP, Brasil

²Faculdade de Odontologia (FO), Universidade de São Paulo (USP), Campus São Paulo, SP, Brasil

³Instituto de Pesquisas em Células-Tronco (IPCTRON), São Paulo, SP, Brasil.

¹R. Santa Adélia, 166, Bangu, Santo André, SP, 09210-170, Brasil

E-mail: karen.kai@ufabc.edu.br, juliana.marchi@ufabc.edu.br

RESUMO

*Fosfato tricálcico (β -TCP) é amplamente utilizado para reconstituição e substituição de tecido ósseo, devido a excelente biocompatibilidade, osteocondutibilidade e composição química e estrutural semelhante aos ossos. O cálcio (Ca^{2+}) presente na estrutura cristalina do β -TCP pode ser substituído por magnésio (Mg^{2+}) em pequenas quantidades, esperando que não apresente efeitos citotóxicos. Neste trabalho, β -TCP puro e Mg-TCP ($\text{Ca}_{1-x}\text{Mg}_x$)₃(PO₄)₂ foram sintetizados via úmida. O precipitado foi envelhecido, filtrado, lavado e liofilizado. Os pós foram calcinados (800°C/1h) e sinterizados (1200°C/1h). Os testes de adesão (contato direto), proliferação (contato indireto) e diferenciação celular osteogênica (contato indireto) foram realizados em diferentes tempos experimentais, utilizando-se células-tronco de tecido adiposo humano. Comportamentos de adesão, proliferação e diferenciação celular foram avaliados por MEV, ensaio colorimétrico MTT e vermelho de Alizarina, respectivamente. Os resultados biológicos *in vitro* demonstraram que os materiais sintetizados são adequados para substituição e reconstituição de tecido ósseo, podendo favorecer a formação de osso novo *in vivo*.*

*Palavras-chave: fosfato tricálcico, substituição iônica, testes *in vitro* de cultura celular, células-tronco de tecido adiposo humano, diferenciação osteogênica.*

INTRODUÇÃO

O β -fosfato tricálcico (β -TCP, β -(Ca₃(PO₄)₂)), pode ser empregado como material para substituição óssea devido a sua biocompatibilidade¹ e osteointegração, propriedades estas conferidas pela sua composição química similar à do osso². O β -TCP é degradado gradualmente pelo organismo, sendo substituído por novo tecido ósseo hospedeiro pela ação dos osteoblastos³. A fase β -TCP apresenta alta solubilidade e alta taxa de dissolução, levando a diminuição da resistência mecânica do implante durante a remodelação óssea⁴. Uma das tentativas de diminuir a taxa de

dissolução e a solubilidade do TCP é a substituição iônica na estrutura cristalina dessa cerâmica por diversos íons^{5, 6, 7, 8, 9, 10}. O magnésio (Mg^{2+}) tem sido um dos principais íons estudados como substituinte do cálcio na rede cristalina do TCP para aumentar a resistência mecânica¹¹. Dopagem de β -TCP com Mg^{2+} mostrou maior estabilidade térmica do pó, com supressão da transição da fase β -TCP para α -TCP, além da diminuição da solubilidade do material quando comparado ao TCP puro^{12, 13}.¹⁴. Quando os íons Mg^{2+} são incorporados nas cerâmicas de fosfato de cálcio, é esperado que o comportamento *in vivo* deste material sintetizado seja mais similar ao osso mineralizado, quando comparado com materiais puros, isto é, sem a dopagem com íons magnésio¹⁵. Testes *in vivo* de HA/TCP dopado com magnésio demonstraram que a biocompatibilidade foi preservada com ausência de citotoxicidade e biodegradação semelhante ao material puro¹².

O objetivo deste trabalho foi à avaliação da capacidade de cerâmicas de fosfato tricálcico induzirem a diferenciação celular osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano *in vitro*. Também foi avaliado o comportamento biológico destas cerâmicas *in vitro*, através dos testes de adesão e proliferação celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese para a obtenção dos pós β -TCP e dopados com magnésio (Mg-TCP, Mg=4,5% mol) foi realizada pelo método de neutralização utilizando H_3PO_4 , $Ca(OH)_2$ e $Mg(OH)_2$ como precursores, de acordo com protocolos de pesquisa desenvolvidos pelo grupo^{11, 16}. Em resumo, as suspensões foram envelhecidas, filtradas e liofilizadas, calcinadas a 800°C/1h. Os pós foram conformados por prensagem uniaxial (~40 MPa, matriz metálica de 6,5mm de diâmetro) e as amostras sinterizadas a 1200°C/1h. As amostras foram esterilizadas por radiação gama (25 kGy, CTRS, IPEN, São Paulo).

Para os experimentos de adesão, proliferação e diferenciação celular, as células-tronco de tecido adiposo (ACSS) foram isoladas de tecido adiposo descartado em cirurgias de lipoescultura (lipoaspiração/lipoenxertia). A suspensão de células ($2,5 \times 10^4$ células/ml) foi semeada nos poços onde previamente foram colocadas as amostras de TCP, em quadruplicata. Como controle, as amostras de TCP foram colocadas somente em contato com meio de cultura DMEM, suplementado com 20% de soro fetal bovino e penicilina-estreptomicina 1%, por 24

hs. As placas foram incubadas pelos períodos experimentais (3 ou 24 hs), a 37°C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após os experimentos, as amostras fixadas e recobertas com ouro foram analisadas por MEV-FEG.

Para os testes de proliferação e diferenciação celular, extratos (0,2 g/ml) foram obtidos colocando-se as amostras de β-TCP em meio DMEM e incubados por 24h. O meio de cultura foi filtrado (filtro de acetato de celulose, poros de 0,2 μm). Para o teste de diferenciação osteogênica, além do meio de cultura regular, foi utilizado um meio de cultura mineralizante (DMEM adicionando-se 10% de SFB, 1% PE, 50μM ácido arcórbico, 2mM β-glicerofosfato, 0,1μM dexametasona). Foi realizado o plaqueamento da suspensão de células (1,0x10⁴ células/ml), com no mínimo 4 repetições. As placas foram incubadas por 24h, a 37°C, sob atmosfera umidificada de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado e foram adicionados 400μL dos extratos obtidos/ poço, em cima da suspensão de células. A proliferação celular foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico), após 24, 48 e 72 horas de incubação. Após os períodos experimentais, o meio de cultura foi trocado por meio fresco (300μL/poço) e acrescentado o reagente MTT (5mg/mL, 30μL/poço). Após 4 horas de incubação (37°C, atmosfera umidificada com 5% de CO₂) das placas protegidas com papel alumínio, foi adicionado DMSO (Dimetilsulfóxido - (CH₃)₂SO) por 15 minutos, sob agitação. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro (560 nm), sendo a viabilidade calculada considerando-se a viabilidade celular do controle como 100%. A diferenciação funcional osteogênica foi avaliada por detecção e quantificação dos depósitos de cálcio utilizando-se o corante vermelho de alizarina (*Alizarin S*) nos períodos experimentais de 14 e 28 dias. Após os tempos experimentais, os poços foram lavados com PBS 1% e as células fixadas com álcool 70% por 40 minutos a 4°C. Após esse período, as células novamente foram lavadas com PBS 1%, secas e uma solução de vermelho de alizarina 1% e hidróxido de amônia 1% (10:1) foi adicionada. Após remoção do excesso de corante secagem das placas, foram obtidas imagens fotográficas centrais de cada poço (4 imagens para cada grupo). As análises qualitativas e quantitativas dos depósitos de cálcio foram realizadas a partir de imagens obtidas por microscópio invertido e utilizando programa computacional *Image J*. Para a análise estatística dos resultados obtidos de proliferação celular e diferenciação osteogênica, foram considerandos a média e o desvio padrão

utilizando-se análise de variância ANOVA complementada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica utilizada para estudar qualitativamente a influência da incorporação de magnésio na adesão de células na superfície das amostras (Figura 1). Nas amostras controle, pode-se observar que as amostras de TCP puro (Fig. 1a) e Mg-TCP (Fig. 1b) apresentam topografia de superfície com rugosidade homogênea. Após 3 horas em contato com as células, as ACSs aderiram a todas as amostras de TCP, apresentando boa adesão celular nas amostras de TCP puro (Fig. 1c) e Mg-TCP (Fig. 1d). As células aderidas apresentaram morfologia irregular, ora estrelada, ora alongada com prolongamentos. Algumas células apresentaram morfologia arredondada, onde o processo de espalhamento celular não avançou, pelo menos nos tempos pesquisados. O mesmo comportamento pode ser observado para essas mesmas composições após 24 horas de contato entre os materiais e as células (Fig. 1e e 1f). Observa-se que após 24 horas de experimento, o processo de adesão celular se mostrou completo, pois as células se espalharam pela superfície do material.

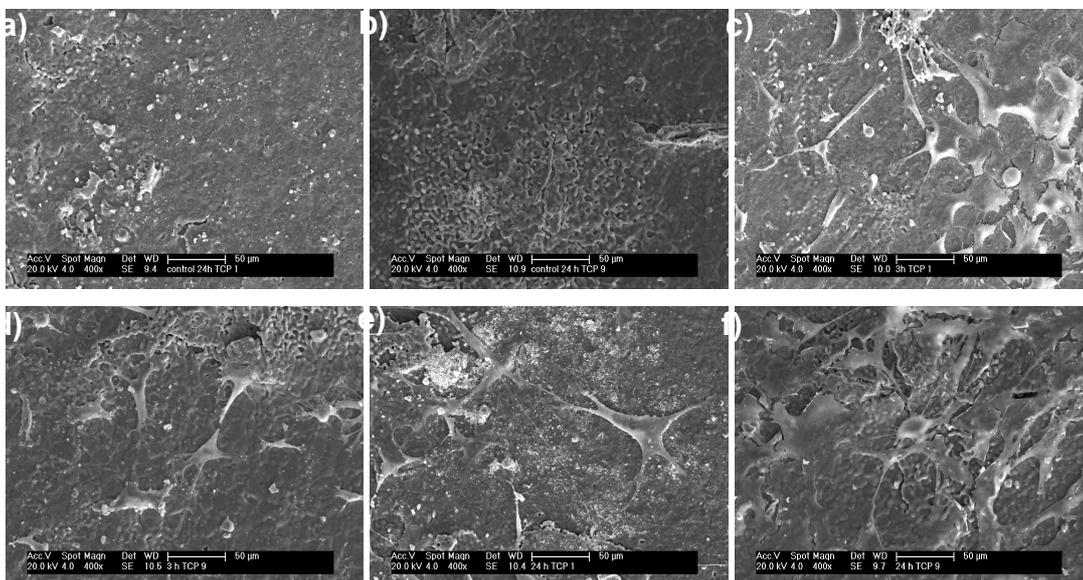


Figura 1: Micrografias eletrônicas de varredura típicas de amostras de TCP: a) e b): expostas apenas ao meio de cultura por 24 horas, TCP puro e Mg-TCP; c) e d) expostas às células de ACSs por 3 horas, TCP puro e Mg-TCP e) e f): expostas às células de ACSs por 24 horas, TCP puro e Mg-TCP.

A análise quantitativa de proliferação celular através de método colorimétrico MTT após 24, 48 e 72 horas de experimento nas amostras sob cultivo em meio regular (este condicionado com as amostras de TCP pura e Mg-TCP) é apresentada na Figura 2. A proliferação celular apresenta-se ascendente com o aumento do tempo experimental, chegando a aproximadamente 100% de viabilidade celular após 72 horas de incubação. Estatisticamente, as amostras não diferem entre si, dentro de um mesmo período experimental. Os resultados indicam que a dopagem do TCP com magnésio não afetou negativamente a viabilidade celular, ou seja, não produziu efeitos citotóxicos quando em contato com as ACSs.

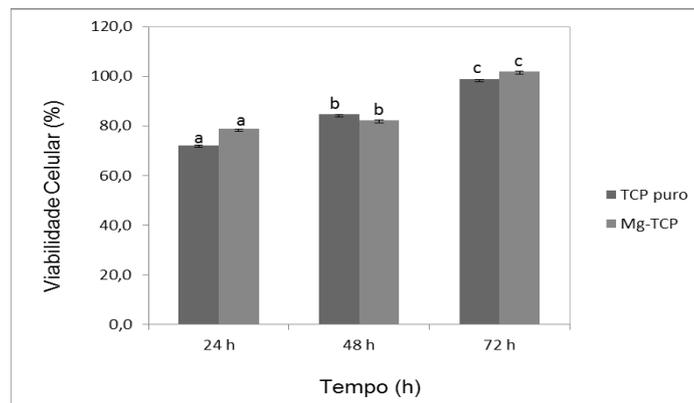


Figura 2: Análise quantitativa da proliferação celular através de método colorimétrico MTT. O controle foi aferido como tendo 100% de viabilidade celular.

Os resultados de adesão e proliferação celular, em conjunto, indicam que todos os materiais são não-citotóxicos. A adição de magnésio na estrutura cristalina do TCP não interferiu de forma negativa tanto na interação material-célula, quanto na proliferação celular. Pode-se inferir que a adesão celular não foi influenciada somente pela composição do material, mas principalmente pelas propriedades físicas do material, neste caso a topografia da superfície. Marchi e colaboradores¹⁶ mostraram que uma topografia de superfície muito irregular e muito rugosa prejudicou a adesão e proliferação celular em alumina. Por outro lado, superfícies polidas, ou seja, mais lisas, também prejudicaram a adesão e proliferação celular. Superfícies com rugosidade intermediária apresentaram melhor adesão e proliferação celular.

A distribuição e morfologia dos depósitos de cálcio corados com vermelho de Alizarina, quando presentes, foram analisadas a partir de imagens obtidas através microscópio de luz após 14 e 28 dias de experimento (Figuras 3 e 4,

respectivamente). A análise qualitativa da formação dos depósitos de cálcio, realizadas após o 14º (Figura 3) e o 28º dias (Figura 4) experimentais, mostrou diferenças na quantidade e na forma dos depósitos de cálcio entre os grupos experimentais. As culturas de células crescidas em meio regular durante 14 (Figuras 3a) e 28 dias (Figuras 4a-c) não apresentaram nódulos de depósitos de cálcio visíveis ao microscópio de luz. Entre as culturas de células cultivadas em meio mineralizante, não houve formação de depósitos de cálcio em 14 dias de experimento (Figuras 3b). Após 28 dias, houve formação de depósitos de cálcio bem definidos e facilmente detectados através da microscopia de luz (Figuras 4d-f). As culturas com meio mineralizante condicionado (28 dias de experimento) com TCP puro e Mg-TCP apresentaram quantidades notáveis de depósitos de cálcio observados através das imagens obtidas por microscopia de luz, quando comparadas com o controle. O grupo controle com meio mineralizante apresentou depósitos de cálcio em menores quantidades, em geral menores e mais dispersos por quase toda a superfície de cultura, quando comparados com os outros grupos experimentais.

Uma vez que as amostras tratadas com meio regular não apresentaram nódulos de depósitos de cálcio (pois não ficaram coloridas após a adição do vermelho de Alizarina), foram feitas as análises quantitativas da área total de formação de depósitos de cálcio em relação às células cultivadas em meio mineralizante condicionado e não condicionado com as amostras de TCP e Mg-TCP (Fig. 6). Pode-se observar que ocorreu a formação de depósitos de cálcio apenas após 28 dias de experimento. As células cultivadas com meio condicionado com Mg-TCP apresentaram maior mineralização nesse período em relação ao TCP puro. As células cultivadas por 28 dias apresentaram maior mineralização do que as células cultivadas por 14 dias no mesmo meio, dados confirmados por ANOVA e pelo teste de Turkey ao nível de 5% de probabilidade. As células tratadas de TCP e Mg-TCP estatisticamente não diferiram entre si, porém apresentam grau de mineralização maior do que o controle.

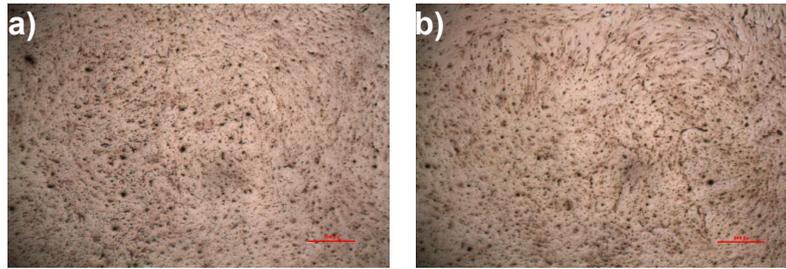


Figura 4: Fotografias representativas de culturas de células para detecção dos depósitos de cálcio após 14 dias de experimento em meio regular (a: Mg-TCP) e mineralizante (b: Mg-TCP) (Microscópio óptico invertido, aumento original de 40x)

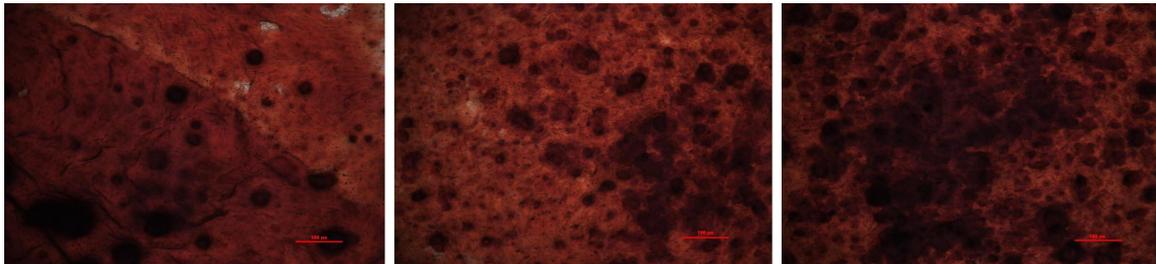
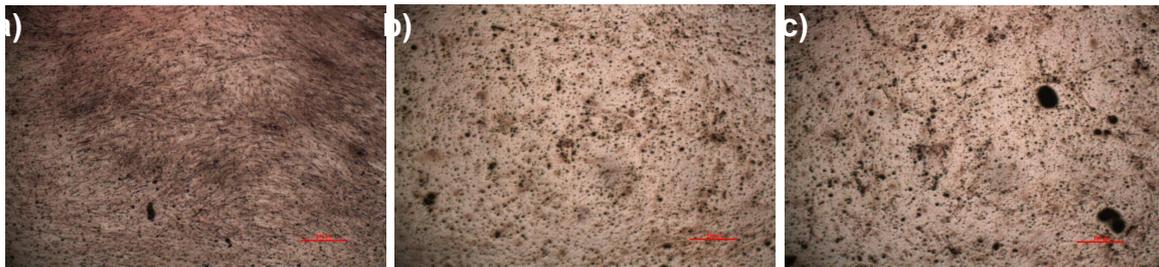


Figura 5: Fotografias de culturas de células para detecção dos depósitos de cálcio após 28 dias de experimento em meio regular (a: controle, b: Mg-TCP puro, c: Mg-TCP) e meio mineralizante (d: controle, e: Mg-TCP puro, f: Mg-TCP) (Microscópio óptico invertido, aumento original de 40x)

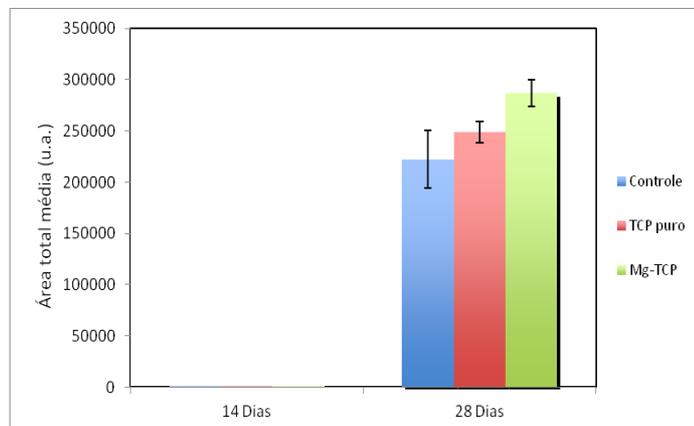


Figura 6: Análise quantitativa da detecção dos depósitos de cálcio após 14 e 28 dias de experimento em meio mineralizante comparando com controle sem condicionamento do meio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental

A partir da análise qualitativa e quantitativa dos depósitos de cálcio, juntamente com os dados de adesão e proliferação celular, pode-se concluir que os materiais a base de fosfato tricálcico, puro ou dopado com magnésio, são materiais não tóxicos e favoráveis à adesão, proliferação e diferenciação celular osteogênica, o que pode favorecer a formação de osso novo *in vivo* no local de implante.

CONCLUSÕES

Todas as amostras de TCP sintetizadas para este trabalho foram consideradas não citotóxicas, indicando que estes podem ser utilizados como biomateriais para substituição e reconstituição de tecido ósseo. As amostras de TCP puro e com adição de 4,5 mol% de magnésio mostraram-se favoráveis à adesão, proliferação e diferenciação celular osteogênica, podendo assim facilitar a diferenciação celular e a formação de novo tecido ósseo *in vivo* no local de implante do TCP.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal do ABC (UFABC), CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro; ao CCTM/IPEN, em especial as Laboratórios de Biomateriais e de Microscopia, pela disponibilidade de utilização de equipamentos de síntese e caracterização dos materiais. A parte experimental de síntese foi realizada com a ajuda do aluno de iniciação científica da UFABC Carlos A. V. Machado.

REFERÊNCIAS

- ¹ VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; IZQUIERDO-BARBA, I. Synthesis of β -tricalcium phosphate in layered or powdered forms for biomedical applications. *Solid State Ionics*, v. 172, p. 445-449, 2004.
- ² DESCAMPS, M.; HORNEZ, J.C.; LERICHE, A. Effects of powder stoichiometry on the sintering of β -tricalcium phosphate. *J. Euro. Ceram. Soc.*, v. 27, p. 2401-2406, 2007.
- ³ HENCH, L. L. *Ceramics, glasses, and glass-ceramics*, in *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Buddy D. Ratner *et al.*(Ed.), Academic Press, 1996.
- ⁴ WEI, X.; UGURLU, O.; ANKIT, A.; ACAR, H.Y.; AKINC, M. Dissolution behavior of Si,Zn-codoped tricalcium phosphates. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 126-135, 2009.
- ⁵ ELLIOT, C. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates: studies in inorganic chemistry*, v. 18, Elsevier Science, 1994.
- ⁶ KANNAN, S.; LEMOS, A.F.; ROCHA, J.H.G.; FERREIRA, J. M. F. Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β - tricalcium phosphate ratios., *J. Sol. State Chem.*, v. 178. p. 3190-3196, 2005a.
- ⁷ KANNAN, S.; LEMOS, A.F.; ROCHA, J.H.G.; FERREIRA, J.M.F. Characterization and mechanical performance of the Mg-stabilized β -Ca₃(PO₄)₂ prepared from Mg-substituted Ca-deficient apatite., *J Am Ceram Soc.*, v. 89, 2757–61, 2005b.
- ⁸ OBADIA, L.; DENIARD, P.; ALONSO, B.; ROUILLON, T.; JOBIC, S.; GUICHEUX, J.; *et al.* Effect of sodium doping in β -tricalcium phosphate on its structure and properties. *Chem Mater*, v. 18, p. 1425–33, 2006.
- ⁹ KANNAN, S.; VENTURA, J.M.; FERREIRA, J.M.F. Aqueous precipitation method for the formation of Mg- stabilized β -tricalcium phosphate: an x-ray diffraction study. *Ceram. Int.*, v. 33. p. 637-641, 2007.
- ¹⁰ MATSUMOTO, M.; SATO, K.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, K.; TODA, Y. Preparation and characterization of β -tricalcium phosphate co-doped with monovalent and divalent antibacterial metal ions. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 3157-3164, 2009.
- ¹¹ MARCHI, J. ; GREIL, P.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A.; MULLER, F. Influence of synthesis conditions on the characteristics of biphasic calcium phosphate powders. *Int. J. Appl. Ceram. Tech.*, v. 6, p. 60-71, 2009
- ¹² RYU, H-S.; HONG, K. S.; LEE, J-K.; KIM, D. J.; LEE, J. H.; CHANG, B-S.; LEE, D-H; LEED, C-K.; CHUNGE, S-S. Magnesia-doped HA/ β -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. *Biomaterials*, v. 25, p. 393-401, 2004.
- ¹³ XUE, W.; DAHLQUIST, K.; BANERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 19, p. 2669-2677, 2008.
- ¹⁴ CACCIOTTI, I.; BIANCO, A. High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation. *Ceramics International*, v. 37, p. 127-137, 2011.
- ¹⁵ FEATHESTONE, J. D. B.; MAYER, I.; DRIESSENS, F. C. M.; VERBEECK, R. M. H.; HEIJLIGERS, H. J. M. Some physical properties of Na- and CO₃-containing apatites synthesized at high temperatures, *Inorganica Chimica Acta*, v. 80, p. 19-23, 1983.
- ¹⁶ MARCHI, J.; DELFINO, C.S.; BRESSIANI, J.C.; BRESSIANI, A.H.A.; MARQUES, M. M. Cell Proliferation of Human Fibroblasts on Alumina and Hydroxyapatite-Based Ceramics with Different Surface Treatments., *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, v. 7, n. 2, p. 139-147, 2010.

OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN ADIPOSE TISSUE STEM CELLS BY MAGNESIUM-DOPED TRICALCIUM PHOSPHATE CERAMICS

K.C. Kai¹, L.S. Ferreira², A. M. S. Pinho³, L.P. Eça³, M.M. Martins² e J. Marchi¹

¹Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Campus Santo André, SP, Brasil

²Faculdade de Odontologia (FO), Universidade de São Paulo (USP), Campus São Paulo, SP, Brasil

³Instituto de Pesquisas em Células-Tronco (IPCTRON), São Paulo, SP, Brasil.

¹R. Santa Adélia, 166, Bangu, Santo André, SP, 09210-170, Brasil

E-mail: karen.kai@ufabc.edu.br, juliana.marchi@ufabc.edu.br

ABSTRACT

Tricalcium phosphate (β -TCP) is widely used for bone repair and replacement due excellent biocompatibility and osteoconducibility, and similar bone chemical and structural composition. Calcium (Ca^{2+}) present in the β -TCP crystal structure can be substituted by magnesium (Mg^{2+}) in small amounts, expecting that without cytotoxic effects. In this work, pure β -TCP and Mg-TCP ($\text{Ca}_{1-x}\text{Mg}_x$)₃PO₄)₂ were wet synthesized. The precipitate was aged, filtered, washed and lyophilized. The powders were calcined (800°C/1h) and sintered (1200°C/1h). Cell adhesion (direct contact), proliferation (indirect contact) and osteogenic differentiation (indirect contact) assays were performed at different experimental times, using human adipose tissue stem cells. Cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation were evaluated by SEM, MTT colorimetric assay and Alizarin red assay, respectively. The in vitro biological results showed that the synthesized materials were suitable as a bone tissue replacement and reconstruction applications, thus could promote de formation of new bone during in vivo procedures.

Keywords: tricalcium phosphate, ionic substitution, cellular culture in vitro experiments, human adipose tissue stem cells, osteogenic differentiation.