

## Efeito da topografia de fosfatos de cálcio densos no comportamento de osteoblastos

Euler Araújo dos Santos<sup>1</sup>, Marcos Farina de Souza<sup>2</sup>, Karine Anselme<sup>3</sup> e Gloria de Almeida Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, PEMM/COPPE, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>3</sup>Institut de Chimie de Surfaces et Interfaces - CNRS, Mulhouse, France

**Abstract: The objective of this work was to evaluate the relative role of the calcium phosphates surface chemistry and surface topography on human osteoblast behavior. Highly dense phosphate ceramics (hydroxyapatite HA and  $\beta$ -TCP) presenting two distinct nano roughnesses were produced. Some samples were gold-sputter coated in order to conveniently mask the surface chemical effects (without any significant modification of the original roughness) and to study the isolated effect of surface topography on cellular behavior. Our results had indicated that the topography of the studied ceramics had not any effect on the cellular adhesion but strong topographical effects were verified on cell differentiation.**

**Palavras-chave: biomateriais, fosfatos de cálcio, osteoblastos, energia de superfície**

### Introdução

O sucesso de um biomaterial para engenharia óssea vai sempre depender de como as proteínas presentes no meio biológico interagem com as superfícies desses materiais. Essa interação inicial vai definir o grau de influência das proteínas sobre as células envolvidas no processo de remodelação, acionando ou não a cascata de eventos que irá resultar na formação óssea. Apesar do grande número de pesquisas em curso, ainda não se tem claro, a partir da caracterização físico-química de um material, se o mesmo será efetivamente integrado ou não. Isto por que a topografia e a química de superfícies são interdependentes [1], o que torna bastante difícil o entendimento do papel isolado de cada uma dessas variáveis sobre a adesão de proteínas e, conseqüentemente, sobre o comportamento das células.

Similarmente ao que ocorre com o titânio submetido a tratamentos de superfície [2,3], variações químicas em cerâmicas de fosfatos de cálcio são geralmente acompanhadas por mudanças topográficas significativas, seja pela forma tomada pelos cristais durante precipitação ou mesmo sobre o crescimento de grão de superfície durante sinterização [4]. Logo, comparar o efeito de diferentes fosfatos de cálcio sobre o comportamento celular não se constitui uma tarefa

facil, na maior parte dos casos. Isto porque os resultados obtidos podem ser um reflexo isolado da topografia de cada cerâmica, e não necessariamente de suas diferenças químicas. Como isso é praticamente impossível se obter cerâmicas com composição química diferente e mesma topografia, propomos aqui um modelo experimental para se isolar efeitos químicos e topográficos sobre o comportamento de células.

Primeiramente, escolhemos dois dos fosfatos de cálcio mais utilizados para regeneração óssea que são a hidroxiapatita (HA) e o fosfato  $\beta$ -tricálcico ( $\beta$ -TCP). Alguns materiais de enxertos são produzidos em cerâmicas bifásicas (HA + TCP) como forma de conjugar a elevada reabsorção do TCP com a maior estabilidade em meios biológicos característico da hidroxiapatita.

Cerâmicas com superfície plana e elevada densidade foram produzidas por prensagem uniaxial de pós, seguido de sinterização. Para se obter elevada densidade diferentes pressões de prensagem foram empregadas, resultando – após a sinterização – em grãos com diferentes dimensões. A fim de se isolar o efeito topográfico sobre o comportamento das células, parte das amostras de HA e  $\beta$ -TCP foram recobertas com um filme fino de ouro. Este procedimento tornou possível o acesso direto ao papel particular da topografia dessas duas cerâmicas sobre o comportamento celular.

O ouro é conhecido como um metal biocompatível, apesar de se ter mostrado que osteoblastos cultivados sobre ele apresentaram menor proliferação e diferenciação quando comparados ao titânio [5]. Por outro lado, ficou também demonstrado que uma camada fina de ouro-paládio foi capaz de mascarar os efeitos tóxicos deixados na superfície de titânio após ataque ácido [6]. Obviamente, a utilização de recobrimentos de ouro sobre implantes seria algo inviável. No entanto, no presente trabalho, ele se mostrou uma ferramenta útil para mascarar a química original das cerâmicas estudadas.

## Materiais e Métodos

Uma hidroxiapatita (HA) estequiométrica, sintetizada pelo método de precipitação em solução no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CBPF, foi utilizada para a produção de pastilhas 100% HA. O fosfato tricálcico (TCP) comercializado pela Merck foi utilizado como base para a produção da forma alotrópica  $\beta$ -TCP. Amostras densas de HA e  $\beta$ -TCP na forma de pastilhas com diâmetros de 7,6 ou 14,8 mm e 1 mm de altura foram obtidas por meio de prensagem a frio, seguido de sinterização a 1150 °C por 4 h. As fases presentes nas pastilhas foram identificadas por difração de Raios-X, DRX.

Metade das amostras foram recobertas com uma fina e homogênea camada de ouro, sendo então denominadas HA[Au] e  $\beta$ -TCP[Au], respectivamente. A morfologia e a rugosidade das superfícies foram determinadas por, respectivamente, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM).

A espessura da camada de ouro foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de seções transversais das pastilhas. A energia de superfície total e as componentes polar e dispersiva, determinadas por meio de medidas em goniômetro, usando três líquidos com diferentes tensões superficiais [7].

Osteoblastos humanos (SaOs2) na 6ª passagem foram cultivados em meio McCoy's 5A modificado (Sigma) e suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após confluência, as células foram tripisinizadas e resuspensas no meio. As pastilhas cerâmicas foram esterilizadas a 180°C por 2h. Inicialmente as pastilhas foram pré-incubadas por 30 minutos em 500 $\mu$ L de meio de cultivo suplementado. Após esse período, mais 500 $\mu$ L de meio de cultivo suplementado (e contendo  $4.0 \times 10^4$  células) foram adicionados. Como superfície controle, foram utilizadas laminulas próprias à adesão celular (Thermanox® Plastic Coverslips, 13mm de diâmetro, NUNCTM, USA). Cada ensaio foi realizado em triplicata para um total de três ensaios independentes. As células foram analisadas após 4h, 1 e 7 dias.

A eficiência de adesão foi determinada após 4 horas de cultura pela razão entre o número de células aderidas em cada material e o número de células aderidas no controle (laminula). A quantificação das células foi feita indiretamente pelo teste MTT (células viáveis) e indica a afinidade inicial das células com a superfície analisada. O espriamento celular após 1 dia foi quantificado usando imagens digitais obtidas em microscopia de fluorescência e determinando-se a razão entre a área ocupada por uma célula aderida em relação à área total da imagem. Já a diferenciação celular foi determinada pela atividade de fosfatase alcalina (ALP) após 7 dias de cultura. As análises estatísticas foram realizadas usando-se ANOVA seguindo do Tukey test.

## Resultados e Discussão

As pastilhas de HA e  $\beta$ -TCP são constituídas por uma única fase, como mostra os difratogramas de raios-X apresentados na Fig.1, correspondendo às fichas JCPDS números 9-432 e 9-169, respectivamente.

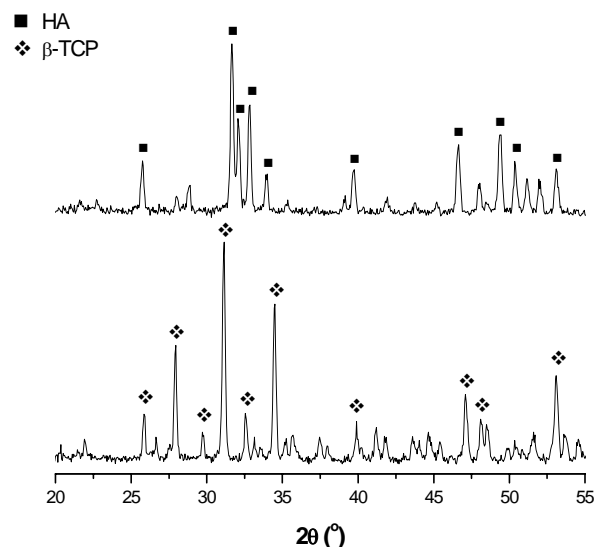


Fig.1 : padrão de difração para HA (a) e  $\beta$ -TCP (b)

Na Fig.2 podem ser observadas as diferenças no tamanho de grão e rugosidade das pastilhas produzidas com a hidroxiapatita - HA (Fig. 2a, 2b) que apresenta grãos mais facetados e menores que a cerâmica  $\beta$ -TCP (Fig. 2e e 2f). Por AFM (Fig. 2c e 2g) obteve-se a rugosidade aritmética média ( $R_a$ ) maior para  $\beta$ -TCP, Tabela 1. Por microscopia eletrônica de transmissão (MET) observa-se na Fig. 2d e 2h o recobrimento de ouro usado para mascarar a química original dos fosfatos. Esse recobrimento não afetou de forma significativa a rugosidade das superfícies originais (sem recobrimento), Tabela 1.

Os valores de energia total de superfície  $\gamma_s$ , Fig. 3, das amostras HA e  $\beta$ -TCP são equivalentes e não foram alterados significativamente com o recobrimento de ouro. No entanto, o recobrimento com ouro provocou uma diminuição na componente polar ( $\gamma_s^P$ ) e um aumento na componente dispersiva ( $\gamma_s^D$ ) da energia, indicando um aumento na hidrofobicidade das superfícies recobertas, quando comparado às amostras originais. A molhabilidade é uma propriedade altamente dependente da química de superfícies, apesar de também poder ser afetada por alterações na topografia. No presente caso, as diferenças topográficas entre HA[Au] e  $\beta$ -TCP[Au] não foram suficientes para afetar a molhabilidade medida.

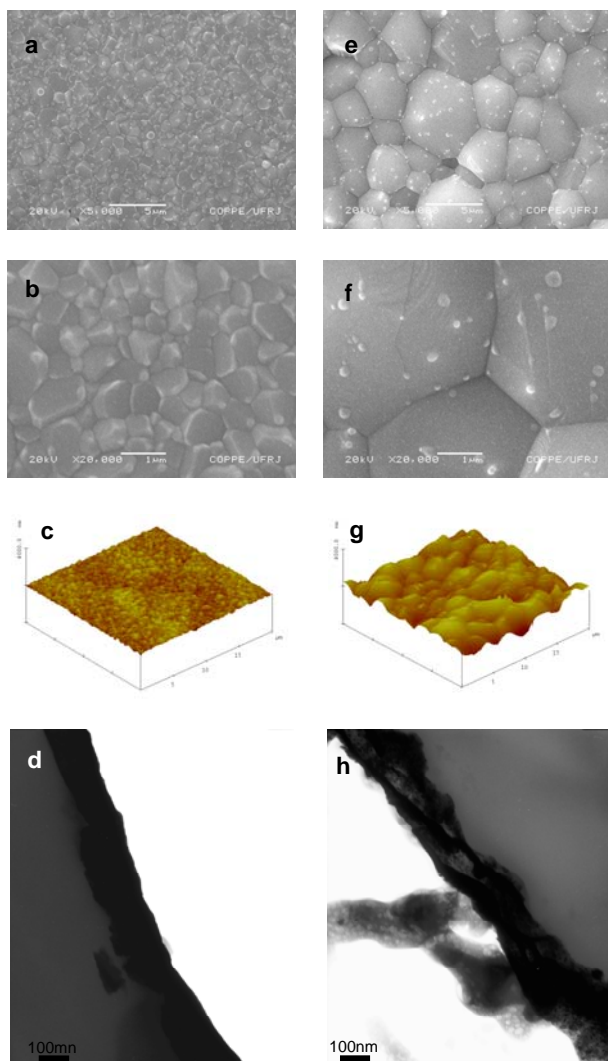


Fig. 2: Imagens de MEV e AFM das pastilhas de HA (a-c) e  $\beta$ -TCP (e-g), e suas respectivas seções transversais em MET (d, h) indicando a camada de ouro depositada nas superfícies.

Tabela 1: Valores de rugosidade medidos por AFM

Amostra	Ra (nm)	
	Original	Recoberta com ouro
HA	$32 \pm 6$	$33 \pm 3$
$\beta$ -TCP	$142 \pm 24$	$144 \pm 15$

A eficiência de adesão celular após 4 horas pode ser observada na Fig. 4 que mostra similar adesão sobre as pastilhas não-recobertas. O recobrimento com ouro provoca o aumento no número de células aderidas, mas não há diferenças significativas entre HA[Au] e  $\beta$ -TCP[Au]. Esse último resultado permite concluir que as diferenças topográficas entre as amostras pouco afetaram a adesão inicial dos osteoblastos.

Já comparando as superfícies com e sem ouro com os dados da Fig. 3, observa-se que o caráter hidrofóbico do ouro induz uma maior adesão de células. Este comportamento sugere que, nas primeiras horas, a adesão é regida basicamente pela molhabilidade da superfície e está em concordância com resultados obtidos por Hallab *et al.* [7].

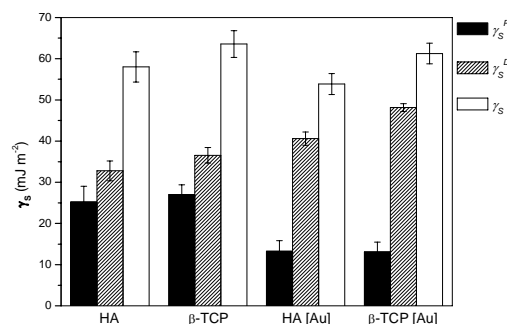


Fig. 3: Energia de superfície ( $\gamma_s$ ) e componentes polar ( $\gamma_s^P$ ) e dispersiva ( $\gamma_s^D$ ) das amostras originais e após recobrimento com ouro.

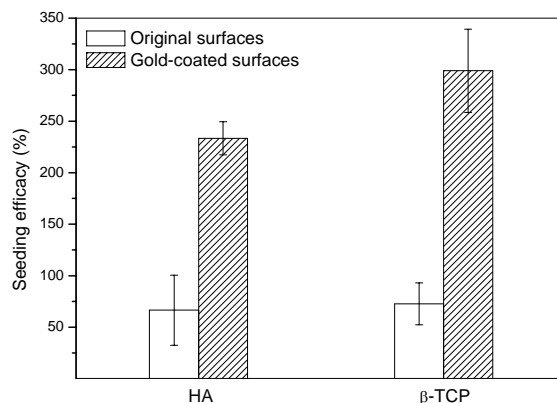


Fig. 4: Razão entre o número de células aderidas nas amostras HA e  $\beta$ -TCP em relação ao controle, após 4h de cultura.

Após 1 dia de cultura a área ocupada por células aderidas foi similar nas amostras recobertas com ouro (Fig. 5).

A grande redução do espriamento celular sobre as cerâmicas de  $\beta$ -TCP quando comparado com as cerâmicas recobertas com ouro,  $\beta$ -TCP[Au], leva a inferir que a química de superfícies do fosfato tricálcico tenha afetado negativamente o comportamento celular. O espriamento celular é fortemente afetado pela natureza e conformação das proteínas adsorvidas na superfície dos materiais [8] e a maior quantidade de fibronectina medida nas amostras HA e nas recobertas com ouro [7] pode então explicar o menor espriamento sobre as amostras de  $\beta$ -TCP.

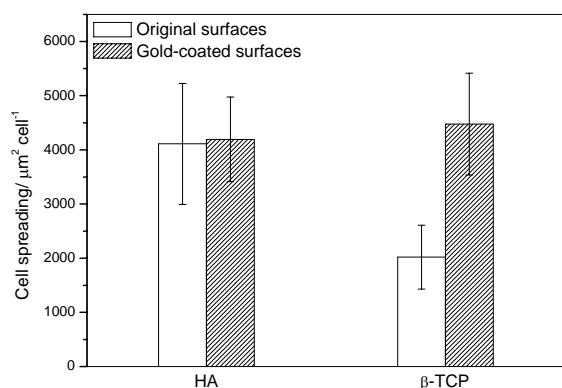


Fig. 5: Espreadimento celular após 1 dia de cultura.

A diferenciação celular representada pela quantidade de ALP, Fig. 6, mostra que há menor diferenciação na amostra β-TCP do que na amostra controle. Após o 7º dia a topografia da amostra HA[Au] parece ser mais favorável à proliferação e diferenciação do que a amostra de β-TCP[Au], já que quimicamente as superfícies são idênticas. Nas amostras recobertas, observa-se menor diferenciação celular como resposta às características químicas do elemento ouro

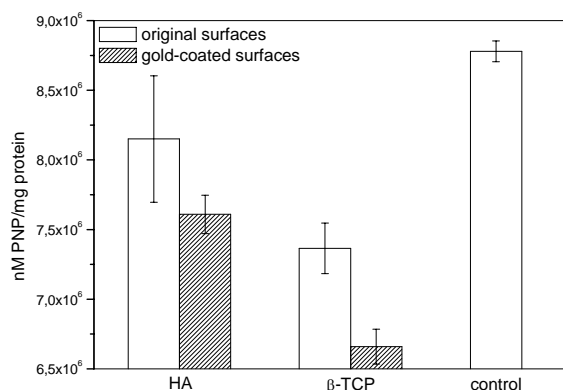


Fig. 6: Diferenciação celular nas amostras originais e recobertas com ouro.

Íons  $\text{Ca}^{2+}$  desempenham um papel importante na proliferação e diferenciação de osteoblastos pela modificação da expressão de canais de cálcio nessas células. Recentemente, MAENO *et al.* [9] demonstraram que pequenas doses de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (baixas concentrações) em meio de cultivo tendem a aumentar tanto a atividade da fosfatase alcalina quanto a expressão de osteocalcina em osteoblastos primários de ratos. Assim, a maior solubilidade do β-TCP (relativamente à HA) poderia explicar a maior importância química do TCP na diferenciação dos osteoblastos ao longo do tempo.

## Conclusão

De uma forma geral, as diferenças topográficas entre as pastilhas de HA e β-TCP pouco afetam a adesão celular nas quatro primeiras horas. Já a

diferenciação celular parece ser favorecida pela topografia da cerâmica de HA que apresentou menores e facetados grãos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro para este trabalho ao CNPq, CAPES e FAPERJ (processos E-26/152.729/2006 e E-26/110.333/2007).

## Referências

- [1] Jones, F.H. (2001) "Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials", *Surface Science Report*, v. 42, p.75–205.
- [2] Vanzillotta, P.S., Sader, M.S., Bastos, I.N., Soares, G.D.A. (2006) "Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments", *Dental Materials*, v. 22, p. 275-282.
- [3] Diniz M.G., Soares G.A., Coelho M.J., Fernandes M.H. (2002) "Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments", *J Mater Sci: Mater Med*, v. 13, p. 421–32.
- [4] Landi, E., Tampieri, A., Celotti, G., Sprio, S., (2000) "Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites", *J. Europ. Ceram. Soc.*, v. 20, p. 2377-87.
- [5] Locci, P., Becchetti, E., Pugliese, M., Rossi, L., Lilli, C., Calvitti, M., Staffolani, N. (1996) "Metal substrates influence the release of glycosaminoglycan and transforming growth factor b by human bone cells" *J Periodontol*, v. 67, p. 1260-1266.
- [6] Anselme, K., Bigerelle, M. (2006) "Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials" *Surface and Coatings Technology*, v. 200, p. 6325-6330.
- [7] Santos, E.A., Farina, M., Soares, G.A., Anselme, K. (2008) "Surface energy of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion", *J Mater Sci: Mater Med*, v. 19, p. 2307-16.
- [8] Hallab, N.J., Bundy, K.J., O'Connor, K., Moses, R.L., Jacobs, J.J. (2001) "Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion", *Cell Adhesion*, v. 7, p. 55-71.
- [9] Maeno, S., Niki, Y., Matsumoto, H., Morioka, H., Yatabe, T., Funayama, A., Toyama, Y., Taguchi, T., Tanaka, J. (2005) "The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture" *Biomaterials*, v.26, p. 4847-4855.