

ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOMATERIAIS INOVADORES EM LINHAGENS CELULARES DE FIBROBLASTO

Natália Wolf de Faria

Sabrina Mendes Botelho

Orientador: Andrei Leitão

Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo

natalia.wolf@usp.br

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo caracterizar *in vitro* a atividade de biomateriais de titânio revestidos por hidroxiapatita com diferentes teores de grafeno em linhagem de fibroblasto de camundongo (Balb/3T3 clone A31), através de ensaios celulares de biocompatibilidade e adesão celular.

Métodos e Procedimentos

Culturas celulares

As células de fibroblasto de camundongo (Balb/3T3 clone A31) foram cultivadas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro de feto bovino. As culturas foram incubadas à 37 °C e atmosfera de 90% de umidade e 5% de CO₂. A passagem das células foi realizada após a cultura atingir, no mínimo, 70% de confluência.

Biomaterial

Os materiais foram esterilizados através de sua submersão em 1,0 mL de álcool 70° e incubação *overnight*. Após o período, foram lavados 10 vezes com meio DMEM.

Ensaio de viabilidade celular

Foi adicionada a uma placa de 24 poços a suspensão com 2,0.10⁵ células mL⁻¹. Após 24h o meio de cultura foi trocado e os biomateriais e o controle positivo (látex) foram transferidos

para a placa. A placa foi incubada durante 72h. Retirou-se os materiais e o meio de cultura. Adicionou-se a solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em DMEM (1,0 mg mL⁻¹) e incubou-se por 3h. A solução de MTT foi retirada e adicionou-se DMSO (dimetilsulfóxido). Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância da placa à 570 nm.

Ensaio de adesão celular

O ensaio foi realizado com duas concentrações celulares: 1,0.10⁶ e 5,0.10⁶ células mL⁻¹. A suspensão celular foi adicionada à placa de cultura contendo os biomateriais e o material de controle (pedaços de placas de cultura). Após 72h de incubação, retirou-se o meio de cultura e lavou-se os materiais com PBS (solução salina com tampão fosfato). As amostras foram secadas com glutaraldeído 2,5%, desidratadas com soluções crescentes de etanol absoluto (30% a 100%) e fixadas com HMDS (hexametildisilazano). Em seguida, foram metalizadas com ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura da Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP).

Análise estatística

A média do controle negativo foi comparada às médias dos outros grupos através da ANOVA One-way e do teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Os resultados de viabilidade celular após contato com os materiais (Figura 1) são provenientes de 4 ensaios independentes em duplicata (N = 4). No controle negativo (C-), estabelecido como 100% de viabilidade celular, não foi adicionado material. O controle positivo (látex, L) apresentou morte celular média acima de 90%, como esperado.

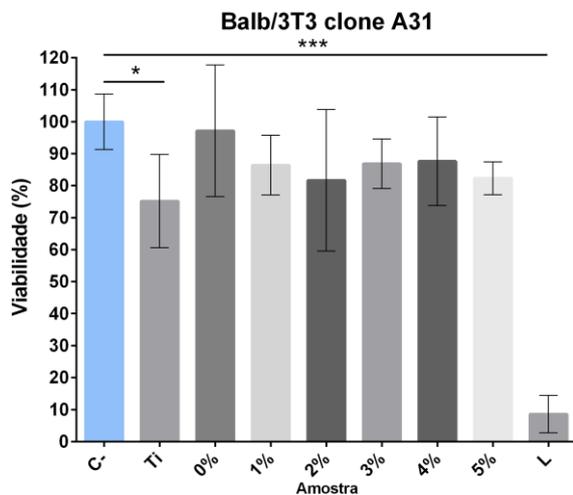


Figura 1: Viabilidade celular do biomaterial com diferentes proporções de grafeno na linhagem celular Balb/3T3 clone A31. C-: controle negativo; Ti: titânio; 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%: titânio revestido por hidroxiapatita com grafeno, representados pelo percentual de grafeno na sua composição; L: látex, controle positivo; *: $p < 0,1$; ***: $p < 0,001$.

Tanto os biomateriais de titânio revestidos somente com hidroxiapatita (0%) quanto aqueles com distintas proporções de grafeno (1%, 2%, 3%, 4% e 5%) são biocompatíveis, pois não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo, obtendo viabilidade celular acima de 80%. O titânio sem revestimento (Ti) apresentou citotoxicidade para a linhagem de fibroblasto, pois houve diferença significativa entre seus resultados e o C-. Parte deste resultado está de acordo com o esperado, posto que tanto o titânio quanto a hidroxiapatita já são utilizados com sucesso em implantes ósseos e dentários¹. O resultado inédito deste trabalho advém da análise da influência das formulações com o grafeno, que

levaram a novos biomateriais com elevada biocompatibilidade celular.

Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura no ensaio de adesão celular, a partir de dois ensaios independentes em duplicata, não foram observadas células aderidas à superfície dos materiais. Considerando que o biomaterial tem como objetivo compor implantes ósseos não cimentados, os quais se fixam mecanicamente ao osso através do crescimento do tecido ósseo entre as porosidades de sua superfície², a incapacidade das células de fibroblasto em aderirem ao material não é um problema, pois sua aplicação não envolve este tipo de interação.

Conclusões

Os ensaios de citotoxicidade determinaram que o biomaterial não é citotóxico, uma vez que todas as suas composições apresentaram viabilidade celular equivalente ao controle negativo. Os ensaios de adesão celular não mostraram células aderidas a superfície dos biomateriais. A ausência de aderência celular não é um problema, visto que a aplicação deste material não necessita deste tipo de interação.

Agradecimentos

Ao Nícolas Lara, do Grupo de Pesquisa em Nanomateriais e Cerâmicas Avançadas (NaCa IFSC-USP), por ceder os biomateriais. A Universidade de São Paulo pela bolsa concedida através do Programa Unificado de Bolsas de Estudo para Apoio e Formação de Estudantes de Graduação (PUB-USP). Ao CNPq e à FAPESP.

Referências

- [1] TATHE, A. *et al.* A brief review: Biomaterials and their application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol.2, suppl. 4, p. 19-23, 2010.
- [2] PILLIAR, Robert M. Cementless implant fixation—toward improved reliability. *Orthopedic Clinics*, v. 36, n. 1, p. 113-119, 2005.