

OBJETIVOS

Avaliação do potencial de regeneração óssea do osso de choco através da monitorização da atividade e diferenciação celular de osteoblastos e osteoclastos em contacto com o material.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas foram divididas em dois grupos, as processadas (CBHAS), submetidas a tratamento hidrotermal, convertendo o carbonato de cálcio em hidroxiapatite e as amostras não processadas (CBS), não submetidas a este tratamento, conservando o carbonato de cálcio na sua constituição.

Utilizaram-se culturas de células estaminais mesenquimais humanas (hMSCs), osteoblastos e osteoclastos.

Colocou-se as CBHAS e CBS numa placa de 48 poços. Adicionou-se as células às amostras e aos poços 2D, deixando a incubar a 37°C durante 2h e adicionou-se o meio.

Avaliou-se:

1. Viabilidade das hMSCs no material através do teste da resazurina;
2. Distribuição das hMSCs nas amostras através do Staining da Actina;
3. Biocompatibilidade através do contacto direto das células com o material e a partir do método da eluição;
4. Diferenciação das hMSCs em osteoblastos, nos blocos, a partir de três experiências - Fosfatase Alcalina (ALP) Activity, Alizarin Red Staining e Van Kossa Staining;
5. Desenvolvimento de osteoclastos, a partir de monócitos, nas amostras através do Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Staining.

RESULTADOS

1. VIABILIDADE

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas, indicando a viabilidade das células nas amostras.

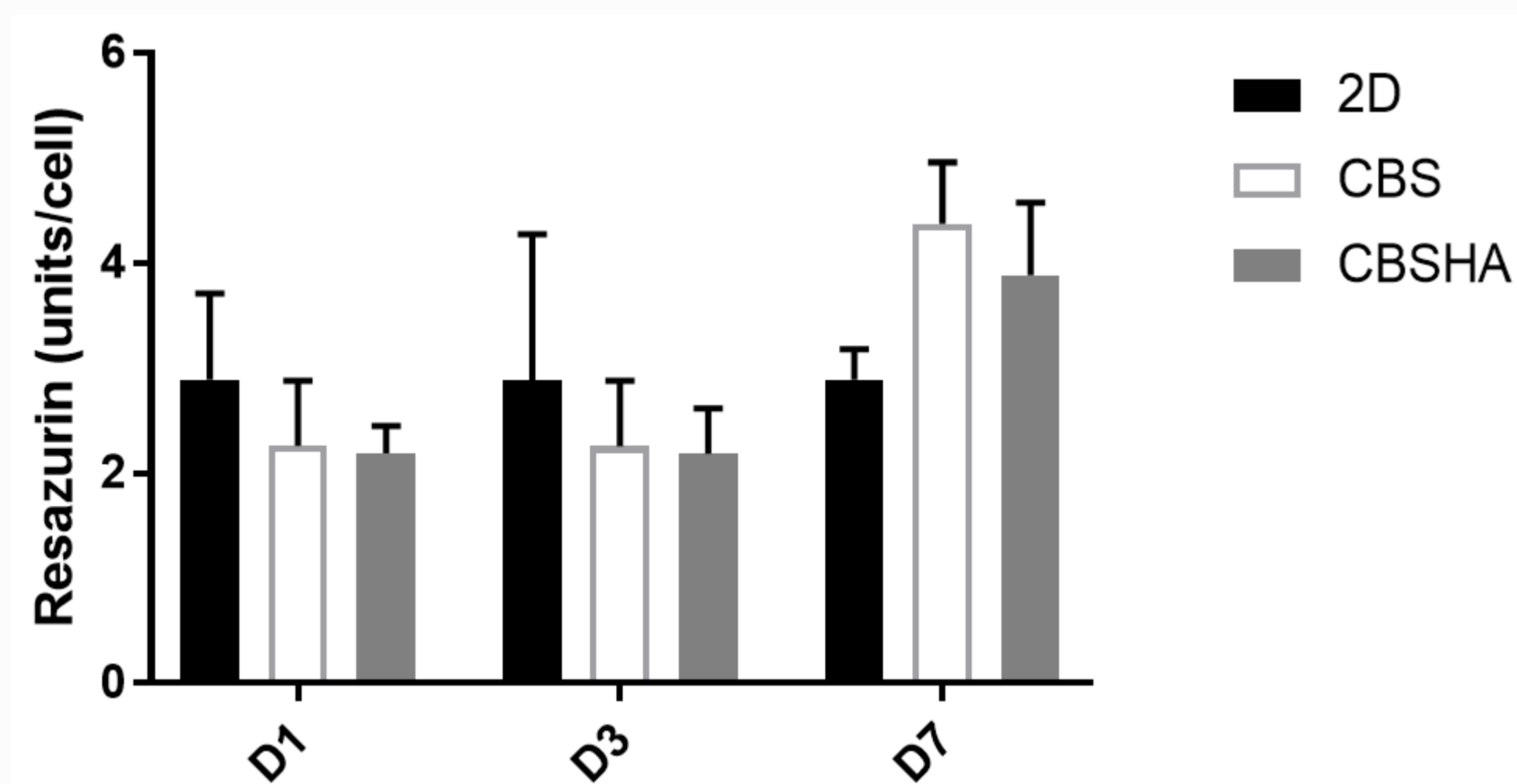


Fig. 1. Viabilidade das hMSCs nas CBHAS e CBS após 1, 3 e 7 dias em cultura. Resultados expressos como \pm SEM.

2. STAINING DA ACTINA

Houve adesão das células às amostras ao longo das camadas paralelas. Parece indicar que ocorreu migração celular ao longo das amostras.

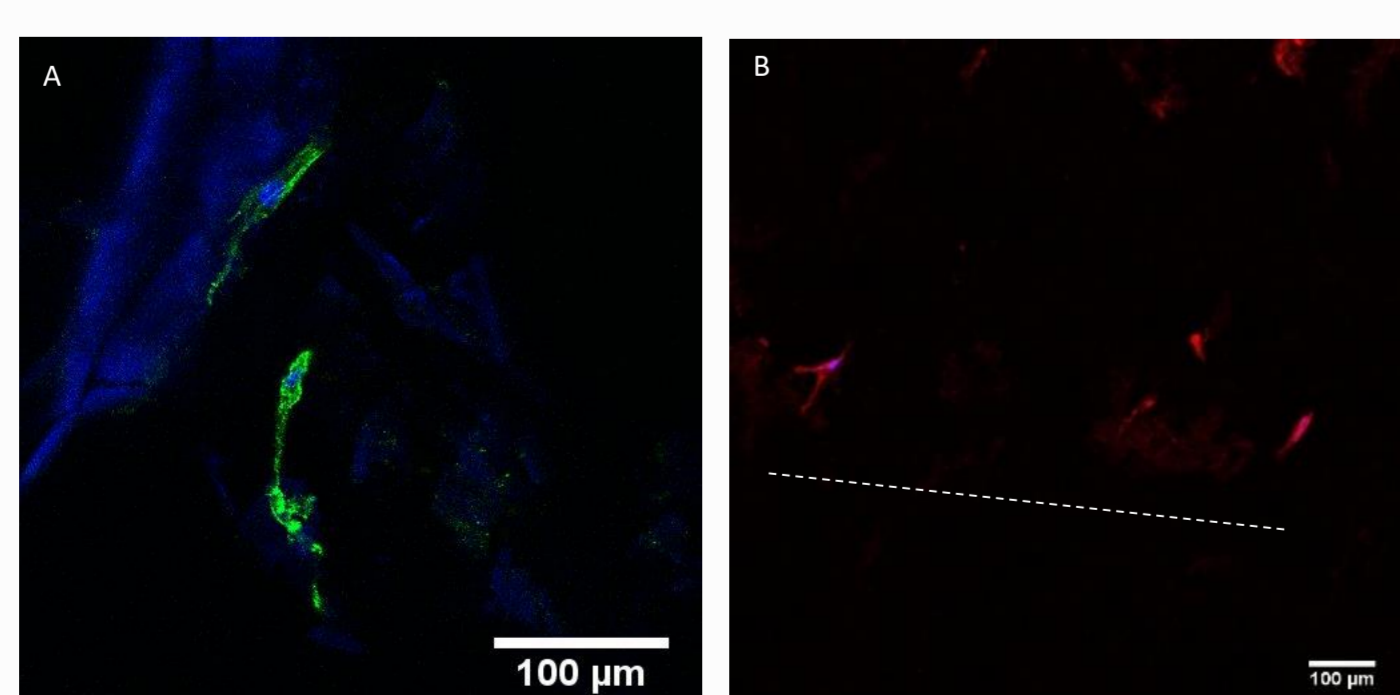


Fig. 2. Imagens representativas do Staining da Actina, ao dia 7, revelando a adesão das hMSCs às amostras e a sua migração ao longo das mesmas. A: Amostras (x40). B: Cortes das amostras. Linha tracejada: limite aproximado da amostra

3. BIOCOMPATIBILIDADE

Diferenças significativas entre 2D e as CBSM e CBSHAM, sugerindo um aumento da atividade metabólica das células nos meios que estiveram em contacto prévio com as amostras.

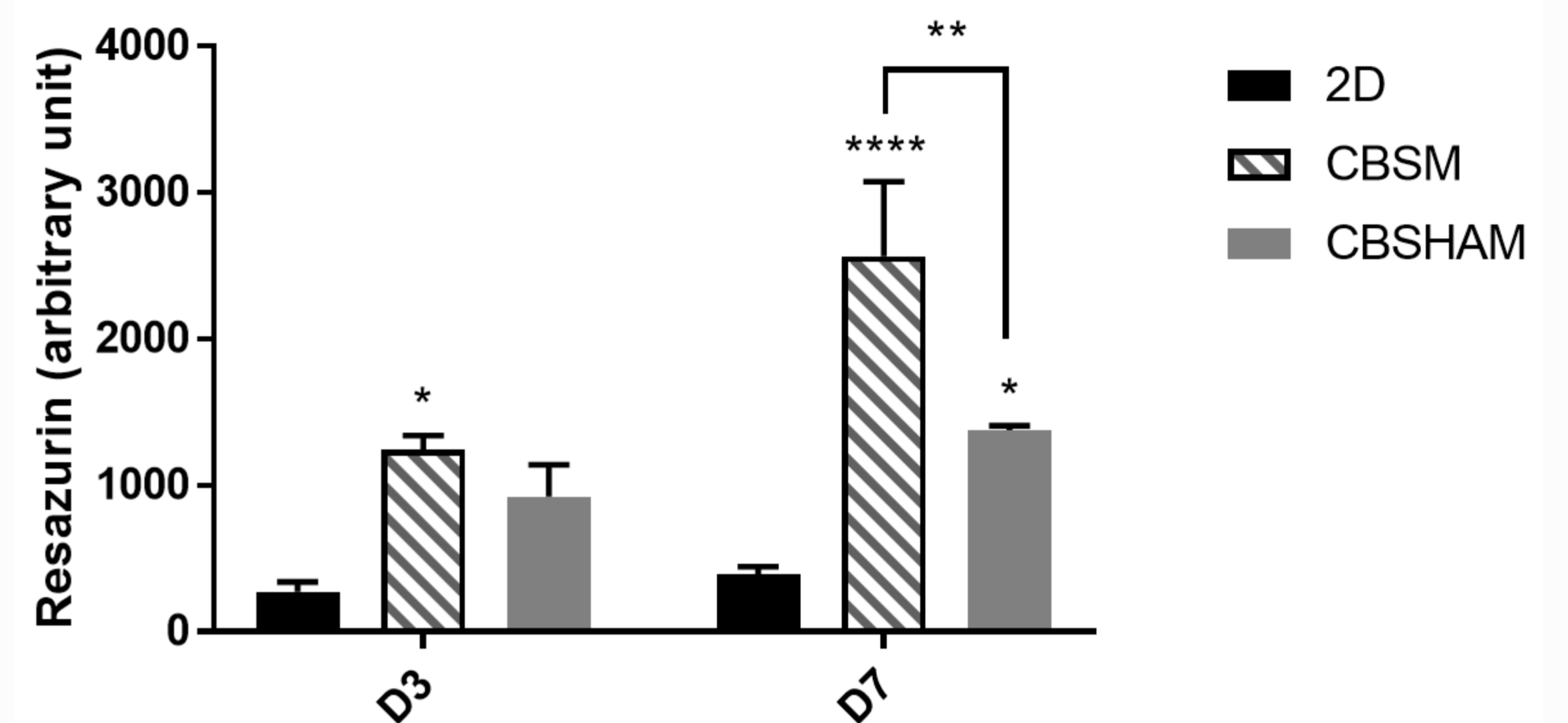


Fig. 3. Método da eluição após 3 e 7 dias em cultura com os meios CBSM e CBSHAM. CBSM: Meio de contacto prévio com as amostras CBS. CBSHAM: Meio de contacto prévio com as amostras CBSHA. Resultados expressos como \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

4. OSTEOLASTOS

Resultados indicam que ocorreu a diferenciação e que as amostras parecem permitir este fenómeno.

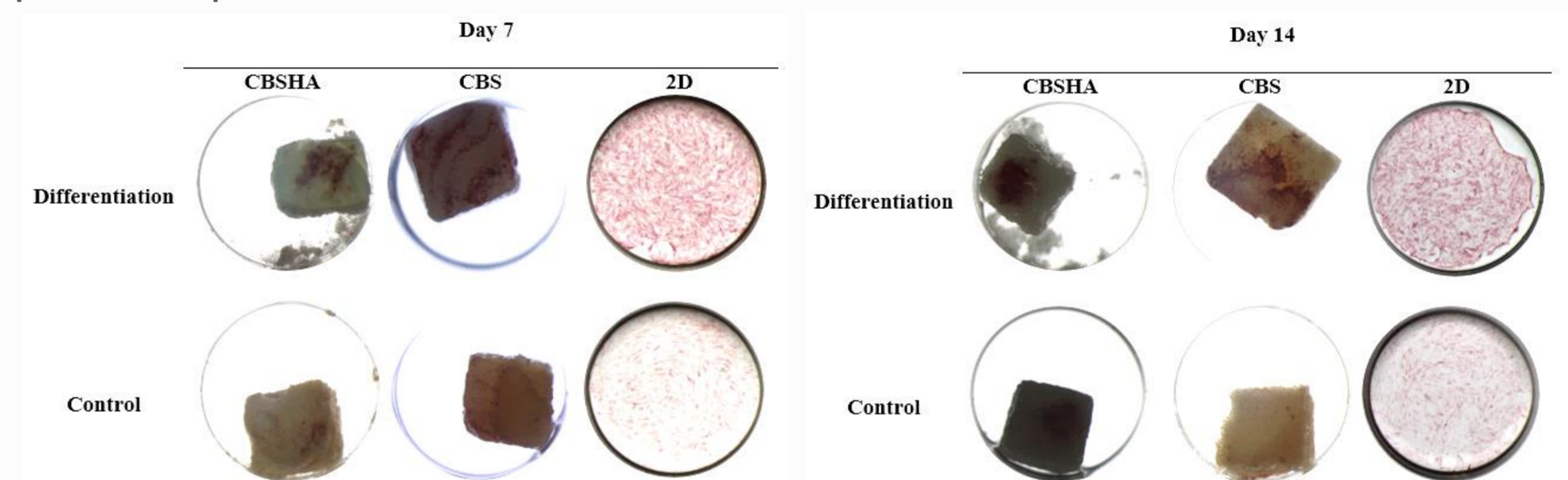


Fig. 4. Imagens representativas do ALP Activity nos dias 7 e 14 da diferenciação.

5. OSTEOLASTOS

Os resultados parecem sugerir a ocorrência de osteoclastogénese na superfície das amostras.

No entanto, são necessários testes adicionais, como a expressão genética de marcadores específicos dos osteoclastos, para se tirarem conclusões.

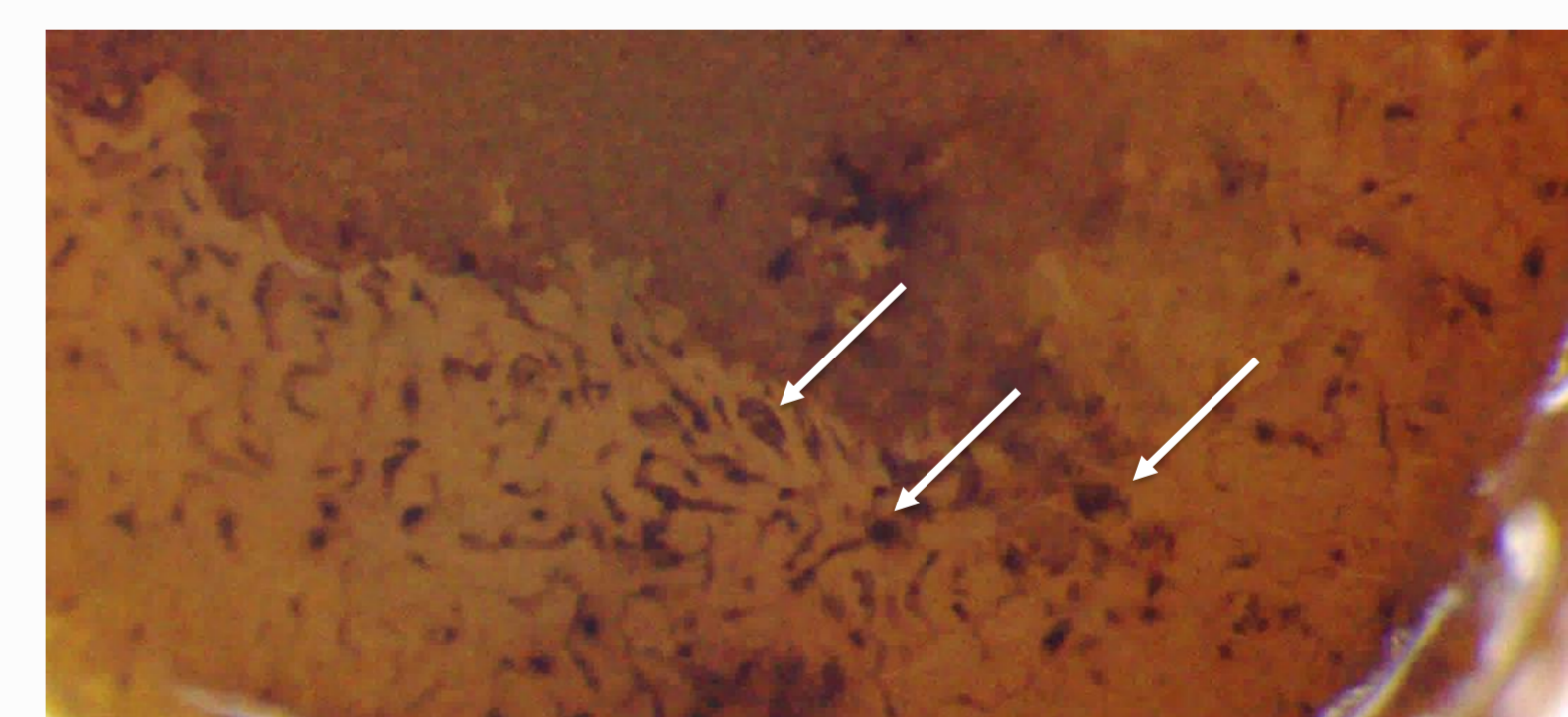


Fig. 5. TRAP Staining efetuado nas amostras. Setas indicam células multinucleadas TRAP – positivas sugerindo serem osteoclastos.

CONCLUSÕES

As amostras apresentaram biocompatibilidade e permitiram a viabilidade, adesão, proliferação e diferenciação celulares. O biomaterial revelou propriedades interessantes que podem levar a considerá-lo um excelente candidato para a preservação da crista alveolar pós-extração dentária e regeneração óssea de defeitos.