

Resumo

Neste estudo, matrizes tridimensionais porosas foram desenvolvidas para manter e acentuar o processo de diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos, *in vitro*. Nós também investigamos o efeito da introdução da subunidade catalítica da telomerase (hTERT) em células tronco mesenquimais humanas, durante o processo osteogênico. Células tronco mesenquimais de rato e humanas foram isoladas da medula óssea e caracterizadas por FACS ou PCR. Para promover a diferenciação, MSC foram cultivadas em meio DMEM modificado contendo 10% de soro fetal bovino, ácido -8 -8 M), -glicerofosfato (10mM) e dexametasona (10⁻⁸ M), -ascórbico (0.2mM), vitamina D3(10⁻⁸ M). As células foram plaqueadas em matrizes feitas de polímeros naturais (quitosana, gelatina, condroitina, alginato e celulose) contendo ou não fosfato de cálcio. As matrizes foram ligadas com EDAC ou genipina. As propriedades físico químicas das matrizes 3D foram avaliadas através de SEM, degradação hidrolítica, testes de compressão e ensaios reológicos. A viabilidade celular e a atividade da fosfatase alcalina foram mediadas com 7, 14 e 21 dias através do ensaio de MTT e ALP, respectivamente. A diferenciação celular foi avaliada por PCR. Células expressando telomerase foram analisadas por PCR semi quantitativo. Os resultados deste estudo mostraram que a proliferação celular de MSC foi melhorada nas matrizes 3D como mostrado pelos ensaios de MTT e ALP. Após o isolamento, marcadores de células tronco mesenquimais humanas, CD29 e CD 44, foram detectados em hMSC por FACS. O CD 29 foi detectado em rMSC por PCR. A diferenciação foi confirmada pela expressão de osteopontina e osteocalcina, no dia 21. Medidas reológicas mostraram que o genipina promove uma polimerização mais rápida e uma melhor performance mecânica do que as matrizes ligadas com EDAC. SEM mostrou um alta porosidade e interconexão de poros em todas as matrizes. O módulo elástico achado nos testes de compressão das matrizes ligadas com EDAC foram 50 vezes maior do que nas matrizes não ligadas e 18 vezes menor do que nas matrizes ligadas com genipina. Células “telomerizadas” expressam 3 vezes mais telomerase do que MSC e 50% mais osteopontina e osteocalcina do que osteoblastos normais. Células expressando telomerase não foram capazes de formar tumores em camundongos NUDE após 60 dias. Nossos resultados mostram que estruturas 3D feitas de polímeros naturais aumentaram a proliferação celular e provaram ser um bom ambiente para a diferenciação osteogênica. Além disso, a expressão da telomerase acentuou o processo osteogênico.