

Abstract

Nowadays, current bone tissue engineering strategies require the availability of adequate cells, biomaterials and biomodulators in order to achieve a successful regeneration of the bone tissue. Most of the present strategies rely on biomaterials implantation in diseased or damage tissues, although clinical morbidity, associated with inflammatory and infectious processes, arises from the surgical implantation.

Several methodologies aiming to prevent infection establishment and development have been assayed, including the local delivery of pharmacological agents targeting pathogenic microorganisms. Tetracyclines, because of their high affinity to mineralized tissues and their broad-spectrum antibacterial action are suitable candidates to be used in biomaterial-dependent bone regenerative strategies. These drugs also seem to play an important role in the modulation of several immuno-inflammatory bone diseases by mechanisms independent from the direct inhibition of protein synthesis – their principal antibacterial mechanism. Although the current knowledge, tetracyclines' effect over bone physiological metabolism is not fully understood.

In this work, the behavior of human osteoblastic-colonized hydroxyapatite and Bonelike[®] (a glass-modified hydroxyapatite) was assayed, in the presence of representative therapeutic concentrations of doxycycline or minocycline.

Initially, first passage human osteoblastic-induced bone marrow cells were cultured, in conditions known to favour osteoblastic differentiation, in the presence of doxycycline (1 to 25 µg/ml) or minocycline (1 to 50 µg/ml). Data revealed that low dosage of both tetracyclines (1 µg/ml) increased cell proliferation in a significant way, without inducing representative alterations in cell phenotype and functional activity – as verified by high alkaline phosphatase expression and increased mineralization of the extracellular matrix. Higher concentrations of both agents induced dose-dependent detrimental effects which were responsible for the hindrance in cell proliferation and differentiation.

Following, cell behaviour was evaluated on seeded hydroxyapatite and Bonelike[®], in the presence of 1 µg/ml doxycycline or minocycline. Both tetracyclines induced

cell behavior on cultures established on the surface of the two substrates. Proliferation was enhanced while phenotypic characteristics (alkaline phosphatase expression and mineral deposition over the extracellular matrix) were maintained. In addition, Bonelike[®] presented an improved biological behavior, in comparison to hydroxyapatite.

Overall, results suggest that local delivery of both doxycycline and minocycline may combine an expected local antibacterial activity with a potential anabolic effect regarding osteoblastic proliferation, at the same time that phenotypic expression and functional activity are maintained. Further, the association of a local factor that acts simultaneously as a bone biomodulator and an antimicrobial agent, with a bone regenerative biomaterial, could contribute to a more predictable clinical outcome.

Resumo

Actualmente, as estratégias de engenharia do tecido ósseo assentam na implantação de células, biomateriais e biomoduladores adequados, que permitem uma regeneração favorável do tecido. A maioria das estratégias actuais recorre à implantação de biomateriais nos tecidos lesados, apesar da descrita morbilidade associada aos processos inflamatórios e infecciosos, decorrentes da implantação cirúrgica.

Recentemente têm sido desenvolvidas diversas metodologias que visam prevenir o estabelecimento e desenvolvimento dos processos infecciosos, incluindo a utilização local de fármacos antibacterianos. As tetraciclinas são fármacos potencialmente adequados para este fim, devido à elevada afinidade para os tecidos mineralizados e ao largo espectro antimicrobiano. Estes agentes farmacológicos desempenham, também, um papel importante na modulação de diversas patologias ósseas de base imuno-inflamatória, através de mecanismos independentes da inibição da síntese proteica – o principal mecanismo de acção

antibacteriana. Apesar do conhecimento actual, o efeito das tetraciclinas sobre o metabolismo ósseo não está completamente esclarecido.

Este trabalho tem como objectivo avaliar o comportamento de células osteoblásticas humanas cultivadas na superfície de hidroxiapatite e Bonelike[®] (hidroxiapatite modificada por biovidros), na presença de concentrações terapêuticas de doxiciclina ou minociclina.

Inicialmente, as células osteoblásticas humanas, derivadas de medula óssea, foram cultivadas na presença de doxiciclina (1 to 25 µg/ml) ou minociclina (1 to 50 µg/ml), em condições que favorecem o processo de diferenciação osteoblástica. Os resultados demonstraram que concentrações mais baixas de ambas as tetraciclinas (1 µg/ml) aumentaram a proliferação celular de forma significativa, sem, no entanto, induzirem alterações no fenótipo e na actividade funcional das células – verificados pela elevada expressão de fosfatase alcalina e aumento da mineralização da matriz extracelular. Concentrações mais elevadas dos dois fármacos induziram alterações dependentes da dose, responsáveis pela diminuição da proliferação e diferenciação celulares.

Seguidamente, o comportamento celular foi avaliado na superfície da hidroxiapatite e Bonelike[®], na presença de 1 µg/ml de doxiciclina ou minociclina. Ambos os fármacos induziram um efeito positivo no comportamento das culturas osteoblásticas estabelecidas sobre os dois substratos. A proliferação foi induzida enquanto que as características fenotípicas (expressão de fosfatase alcalina e deposição mineral na matriz extracelular) foram mantidas. Por outro lado, o Bonelike[®] apresentou um comportamento biológico mais adequado que o da hidroxiapatite.

De forma geral, os resultados sugerem que a utilização local de doxiciclina ou minociclina pode combinar uma acção antimicrobiana localizada com um potencial efeito anabólico relativamente à proliferação osteoblástica, ao mesmo tempo que a expressão fenotípica e a actividade funcional são mantidas. Adicionalmente, a associação de um factor local, que actue simultaneamente como um biomodulador do tecido ósseo e um agente antimicrobiano, com um material de regeneração

óssea, pode contribuir para uma melhoria da eficácia das estratégias clínicas actuais.