

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E BIOMATERIAIS NA REGENERAÇÃO DA LARINGE

Aluna: Daniela Burguêz ^{1,2} Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke ^{1,2,3,4}

¹ Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia; ² Laboratório de Células-tronco, Instituto de Ciências Básicas da Saúde; ³ Programa de pós-graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande Sul; ⁴ Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre, RS, Brasil.

Email: patriciapranke@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos envolve o uso de biomateriais que oferecem suporte às células, mimetizando o ambiente extracelular com o objetivo de auxiliar na regeneração do tecido. O presente estudo combinou o uso de matrizes produzidas por prototipagem rápida (impressão 3D) e matrizes nanoestruturas para investigar a interação entre os biomateriais e as células-tronco mesenquimais (CTMs), aliando essas novas tecnologias para o desenvolvimento de um substituto de cartilagem de laringe.

MATERIAIS E MÉTODOS

As CTMs foram isoladas de cordão umbilical e caracterizadas pela morfologia, pela citometria de fluxo e por sua capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. As matrizes 3D foram desenvolvidas com o polímero policaprolactona (PCL), por meio da fabricação aditiva, na impressora 3D Fab@CTI, pelo processo de extrusão de filamentos fundidos em parceria com o Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), em Campinas/SP. As nanofibras foram produzidas por eletrospinning com o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) dissolvido em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP). As estruturas, matrizes 3D + nanofibras, foram esterilizadas sob luz ultravioleta. A avaliação da morfologia e do diâmetro das fibras produzidas por eletrospinning foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células foram semeadas em três diferentes densidades, de cada lado do biomaterial híbrido, com 2 dias de diferenciação, usando as seguintes densidades celulares: 8.500; 25.500 ou 51.000 CTMs. Totalizou-se, com isso, uma concentração de 17.000, 51.000 ou 102.000 células cultivadas, respectivamente. Os testes biológicos foram realizados após 48h da 2ª semeadura. A adesão celular foi analisada através da coloração histoquímica com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), bem como por faloidina. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico que utiliza o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). A citotoxicidade celular foi avaliada por meio da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). A análise estatística foi realizada via ANOVA, seguida do teste de post-hoc de Bonferroni, utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0.

RESULTADOS

As células apresentaram morfologia típica de CTMs, com aderência ao plástico, apresentando positividade para os marcadores de superfície CD73/PE, CD90/FITC, CD105/APC e negatividade para CD14/FITC, CD34/PE, CD45/FITC e HLA-DR/FITC. As células foram capazes de se diferenciar nas três linhagens mesodérmicas analisadas (figura 1). As nanofibras mostraram diâmetro de 645 ± 26 nm, sem presença de beads. Os resultados mostraram que não foram observadas diferenças estatísticas significativas na viabilidade celular entre as matrizes e o poço controle nas mesmas concentrações de CTMs (figura 2). O teste de LDH mostrou que os suportes não foram citotóxicos, com equivalência estatística ao poço controle negativo (figura 3). Por meio da microscopia de fluorescência a laser, foi possível observar células em ambos os lados das superfícies dos suportes (figura 4). Pela MEV, foi possível observar que as nanofibras integraram-se aos moldes 3D e com adequada aderência das células aos 2 tipos de biomateriais utilizados (figura 5).

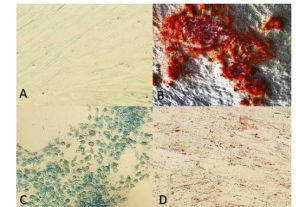


Figura 1. Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical em três linhagens mesodérmicas. Em (A), células cultivadas em meio DMEM controle. Diferenciação das CTMs com os meios de diferenciação para os seguintes tipos: (B) osteogênico, (C) condrogênico e (D) adipogênico, coradas com alúmen (red), Alcian Blue e Oil Red O, respectivamente.

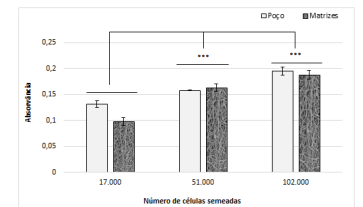


Figura 2. Avaliação da viabilidade (por MTT) das células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical cultivadas em diferentes densidades sobre poços ou matrizes 3D cobertas por eletrospinning.

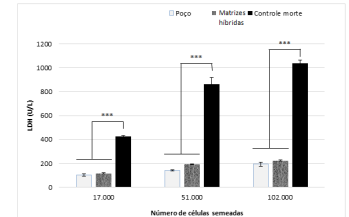


Figura 3. Avaliação da citotoxicidade (por liberação de LDH) das células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical cultivadas em diferentes densidades sobre poços ou matrizes 3D cobertas por eletrospinning, bem como controle de morte celular (Triton).

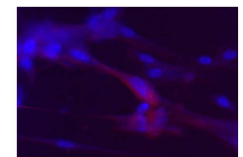


Figura 4. Microscopia de fluorescência a laser de CTMs com o núcleo corado com DAPI (azul) e filamento de actina do citoesqueleto corado com faloidina (vermelho) após 5 dias de cultura. Aumento de 400X.

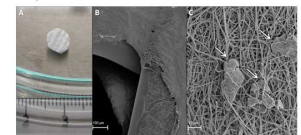


Figura 5. (A) aspecto microscópico e (B) análise de MEV do suporte 3D de PCL, coberto por fibras de PLGA, confeccionadas por eletrospinning. (C) MEV com setas indicando a interação das CTMs com o biomaterial fibroso.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As nanofibras combinadas com as matrizes 3D garantiram estabilidade mecânica aos suportes produzidos. As CTMs possuem interessantes características para uso na medicina regenerativa como a alta capacidade de proliferação e diferenciação celular, bem como a liberação de fatores de crescimento, que auxiliam na regeneração tecidual. A continuidade do estudo objetiva a regeneração da cartilagem da laringe de porcos lesados cirurgicamente, com a utilização de células-tronco cultivadas nas matrizes híbridas produzidas.