

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM MATRIZES DE NANOFIBRAS ALINHADAS CONTENDO FATORES DE CRESCIMENTO

Virginia Etges Helfer¹, Thayane Crestani¹, Kerlin Quintiliano¹, Davi Silveira¹, Patricia Pranke^{1, 2}, Diogo André Pilger¹

¹Laboratório de Hematologia e Células-Tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

²Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT); Porto Alegre, RS, Brasil

virginia.etges@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

As células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos humanos (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* – SHEDs) possuem um elevado potencial de proliferação e clonogenicidade quando comparadas às células-tronco mesenquimais (CTMs) provenientes de outras fontes celulares. A associação dessas células com matrizes de nanofibras contendo fatores de crescimento é uma estratégia que permite otimizar a regeneração tecidual, uma vez que as matrizes evitam que as células migrem para outros locais e a liberação controlada do fator de crescimento favorece a proliferação celular no local da lesão. O objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar as SHEDs, padronizar a produção de nanofibras alinhadas contendo fatores de crescimento (Fator de Crescimento Epidermal – EGF e Fator de Crescimento Neural - NGF) além de avaliar o metabolismo celular sobre estas matrizes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e caracterização das SHEDs

A polpa dentária foi removida e as células tratadas com colagenase a 37°C por 1 hora. Após 24 horas, as células não aderentes foram removidas e as aderentes cultivadas até 90% de confluência, sendo então plaqueadas a uma densidade de 10³ células/cm². A caracterização das CTMs foi realizada por sua capacidade aderente, diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica e perfil imunofenotípico.

Produção das matrizes de nanofibras

As matrizes foram obtidas através da técnica de *electrospinning* com a utilização de solução polimérica de poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) 15%, 0,2% de Span 80 e 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, formando a fase oleosa. Os fatores de crescimento foram incorporados às matrizes, separadamente, através de uma emulsão contendo albumina 5% e 1 µg/mL de EGF ou NGF. O alinhamento das fibras foi obtido pela utilização de cilindro rotatório (2.500 rpm) (Figura 1).

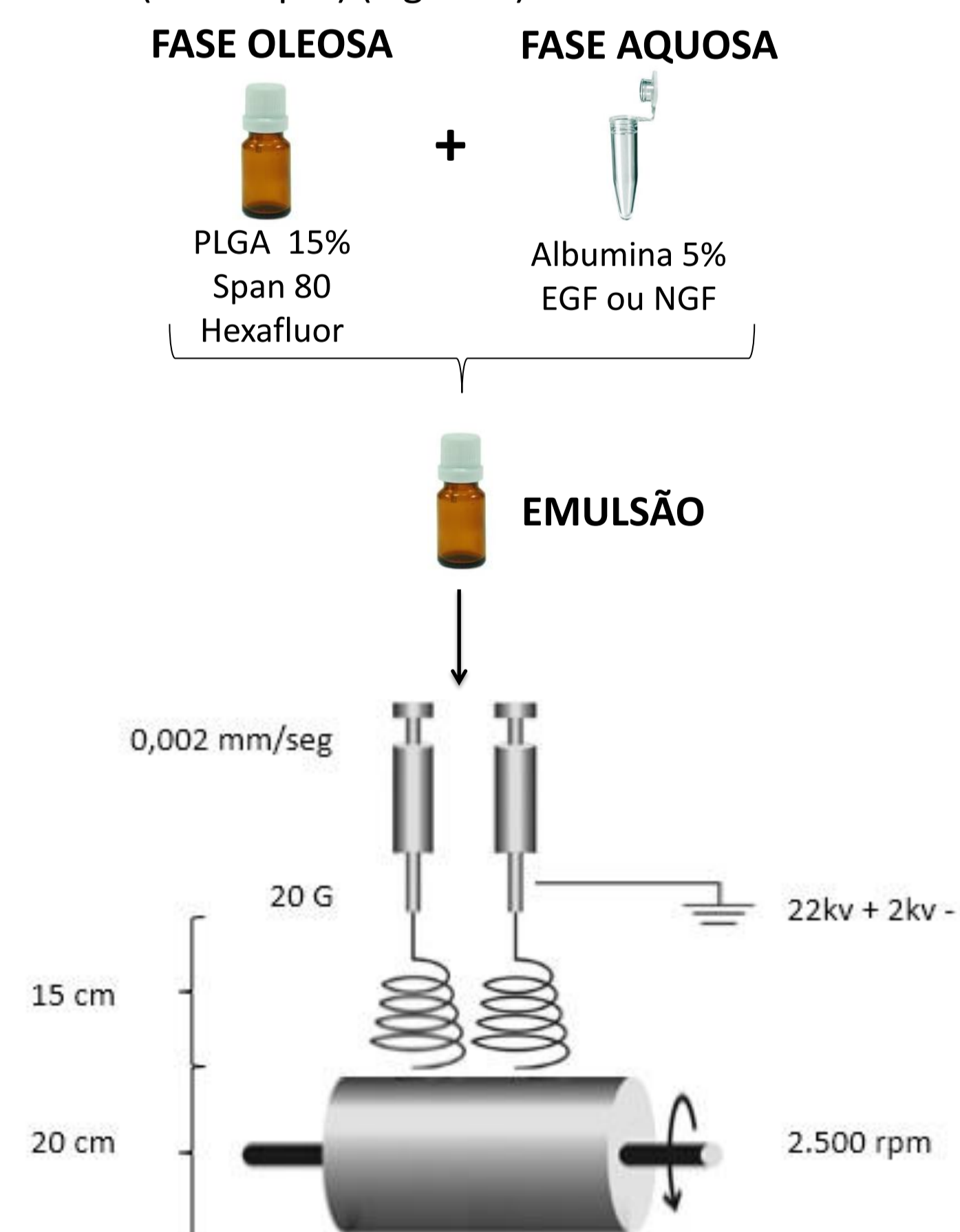


Figura 1. Produção das matrizes alinhadas pela técnica de *electrospinning*

Caracterização das matrizes

A morfologia das fibras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a estimativa do diâmetro obtida através do *software ImageJ*.

Avaliação do metabolismo celular

As SHEDs foram semeadas nas matrizes e foram avaliadas conforme a proliferação celular. Após 1, 4, 7, 14 e 21 dias de cultivo, as células foram incubadas com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) durante 2 horas e as absorvâncias foram medidas.

RESULTADOS

As SHEDs foram isoladas com sucesso e caracterizadas pelo seu perfil imunofenotípico (Tabela 1) e pela sua capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica (Figura 2) como CTM (n = 2).

Tabela 1: Perfil imunofenotípico das SHEDs analisado por citometria de fluxo

Marcador	Expressão (%)		
	Amostra 1	Amostra 2	Média
CD29	95.5	99.0	97.2
CD73	99.0	99.0	99.0
CD90	98.4	99.7	99.0
CD44	92.1	85.5	88.0
STRO-1	1.0	0.5	0.7
CD14	5.3	0.8	3.0
CD34	0.0	0.4	0.2
CD45	0.1	0.4	0.2
CD184	0.0	0.0	0.0
HLA-DR	0.4	0.8	0.6

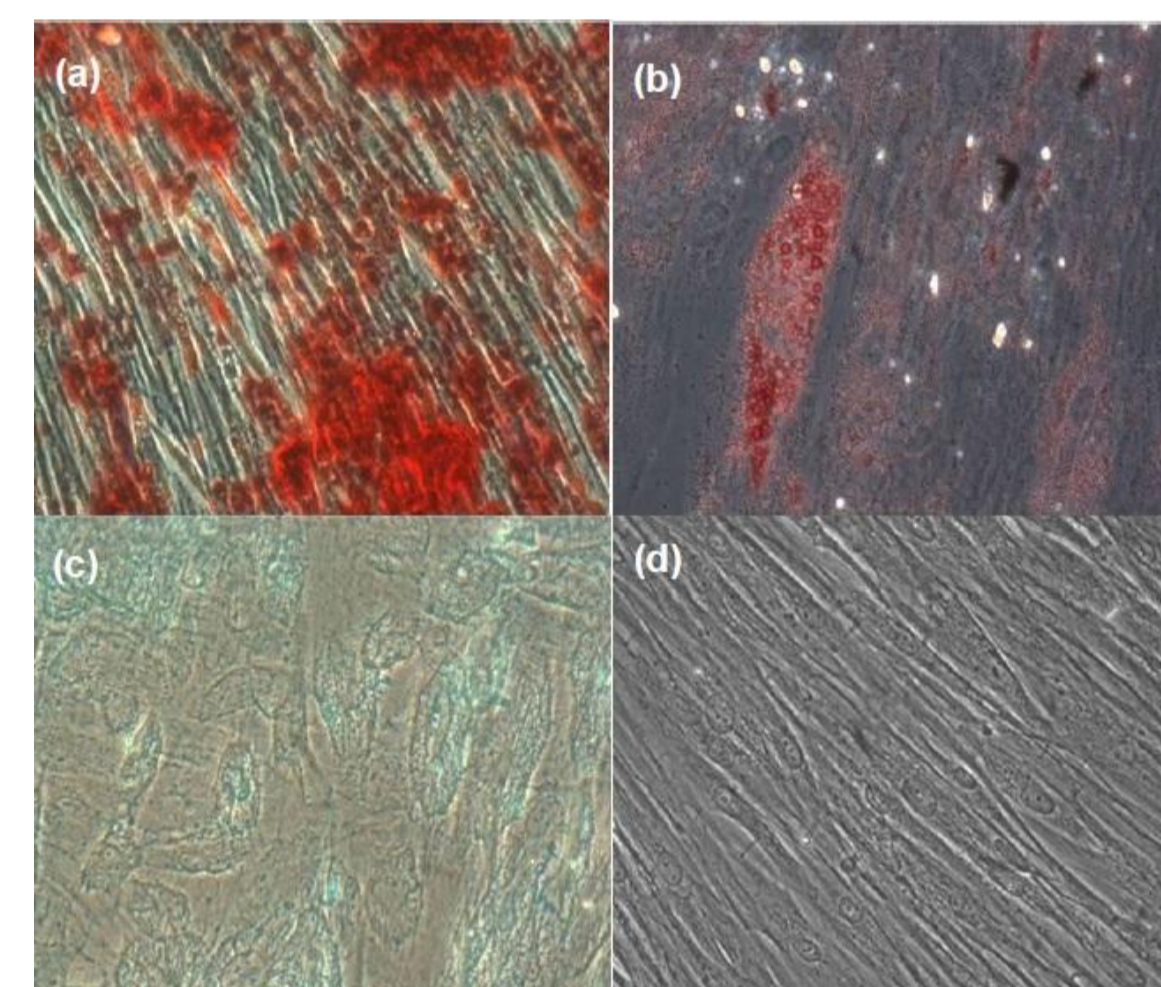


Figura 2: Diferenciação das SHEDs nas linhagens osteogênica (a), adipogênica (b), condrogênica (c), marcadas com Alizarin Red, Alcian Blue e Oil Red, respectivamente; grupo controle (d)

As nanofibras obtidas (Figura 3) apresentaram evidenciado alinhamento com morfologia lisa, ausência de *beads* e diâmetro médio de 548±29 nm, 559±197 nm e 329±87 nm, respectivamente para as matrizes de PLGA, PLGA/EGF e PLGA/NGF (n = 3).

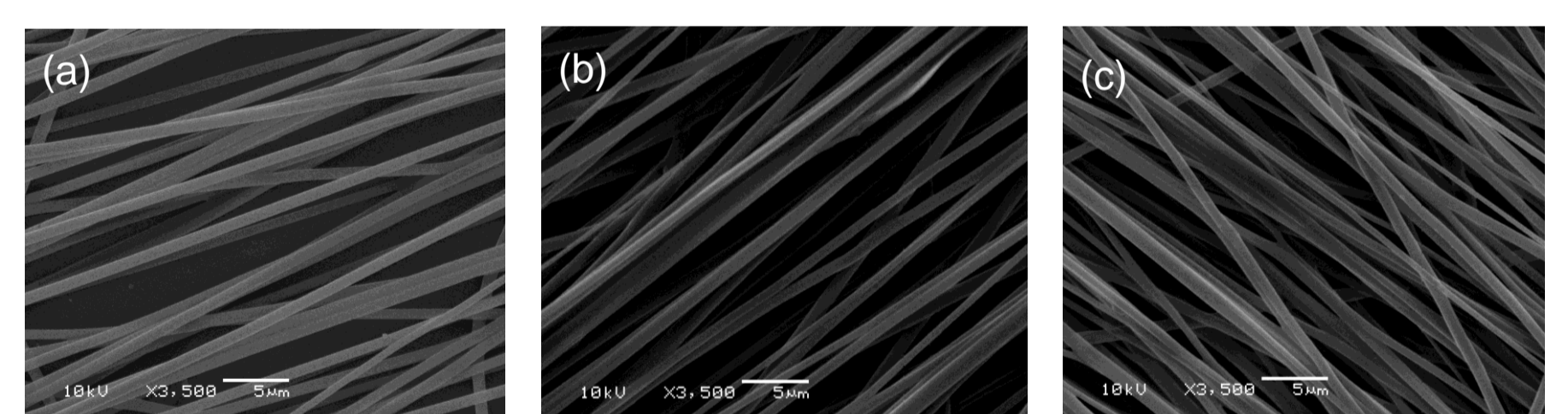


Figura 3: Nanofibras produzidas por *electrospinning* de PLGA (a), PLGA/EGF (b) e PLGA/NGF (c)

Os resultados do metabolismo celular foram expressos em absorvância e estão representados na Figura 4 (n = 5).

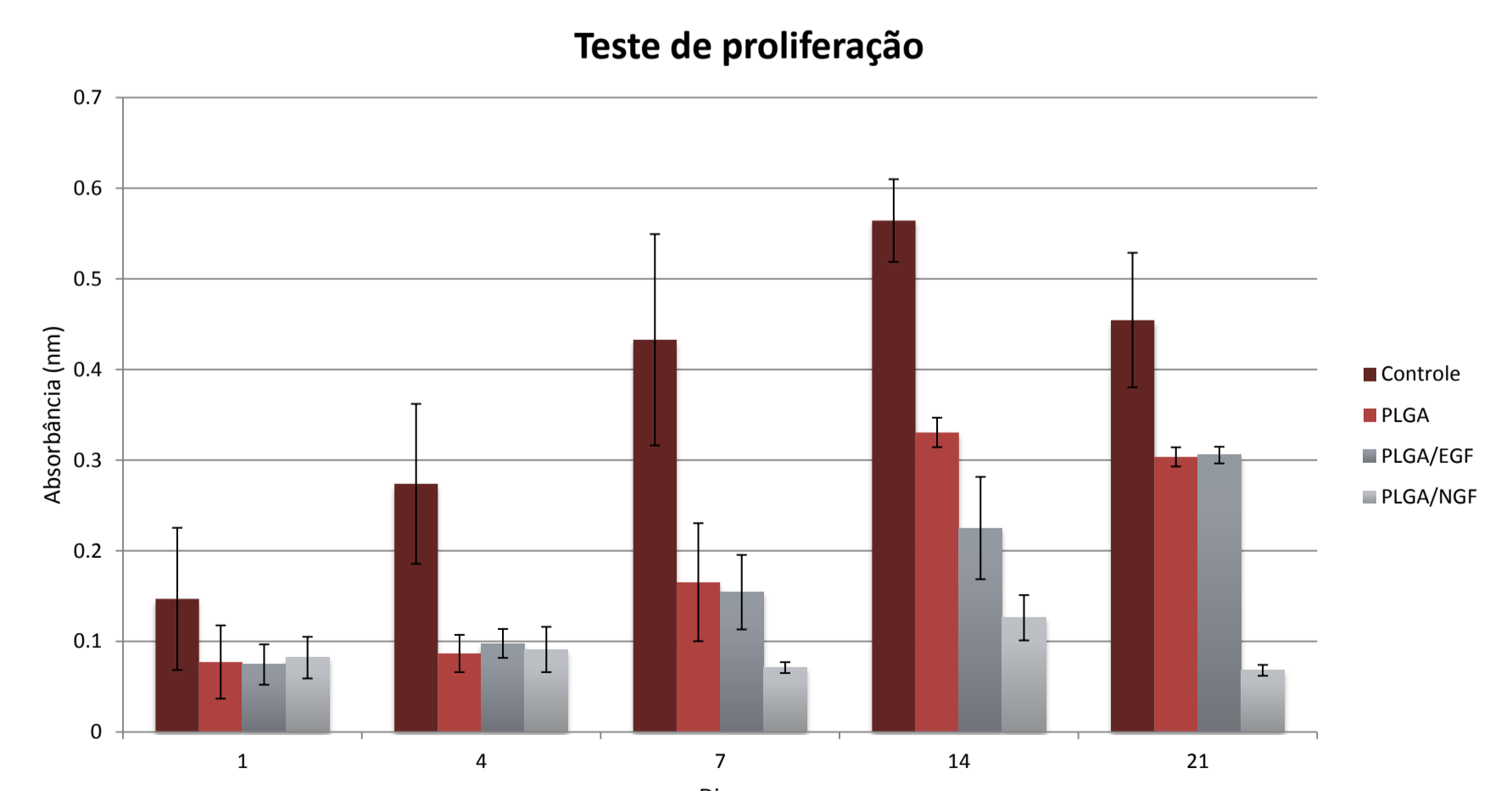


Figura 4: Avaliação da proliferação celular das CTM sobre os diferentes grupos de nanofibras em diferentes tempos realizado através do teste de MTT

CONCLUSÕES

A associação das nanofibras com o EGF estimulou o metabolismo celular, como evidenciado no grupo PLGA/EGF, sugerindo que este fator contribua para a proliferação celular e corroborando com dados prévios da literatura. Portanto, o uso da técnica de *electrospinning* para a incorporação de moléculas bioativas pode ser uma boa estratégia para a engenharia de tecidos.