

Efeito de diferentes métodos de esterilização sobre matrizes de PLGA produzidas por *electrospinning*

Daikelly Iglesias Braghirolli¹, Daniela Steffens^{1,2}, Kerlin Quintiliano¹, Gerson Acasigua⁴, Douglas Gamba⁵, Ana Lúcia Freitas², Adelina Mezzari², César Petzhold⁵, Carlos Alexandre Netto⁶, Patricia Pranke^{1,3,7}

1 – Laboratório de Nanobiotecnologia e Células-Tronco, 2 – Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia; 3 – Pós-graduação em Ciências dos Materiais; 4 – Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia; 5 – Instituto de Química; 6 – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 7 - Instituto de pesquisa com Células-Tronco, Porto Alegre, RS, Brasil
daikely@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma promissora ferramenta para a reconstituição de órgãos e tecidos. Ela associa o uso de células a biomaterias na forma de matrizes que agem como suportes propiciando a adesão, desenvolvimento e proliferação celular. Uma etapa crucial no uso dessas matrizes ou *scaffolds* é a sua esterilização para posterior cultivo celular e aplicação clínica. Contudo, o procedimento de esterilização pode acarretar mudanças nas propriedades das matrizes e, conseqüentemente, na interação das células nas matrizes. Nesse trabalho foram avaliados os efeitos de diferentes métodos de esterilização sobre as nanofibras de PLGA produzidas por *electrospinning* e seu efeito sobre a adesão de células-tronco às nanofibras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matrizes de PLGA (75:25) 12% foram produzidas pelo procedimento de *electrospinning* durante 3h. Após, foram esterilizadas com etanol 70% (0,5; 1 e 2 horas), radiação ultravioleta (UV) (0,5; 1 e 2 h) e solução de antimicrobianos: penicilina/estreptomicina e fungizona (1, 2, 4 e 6h). O peso molecular polimérico, a morfologia e diâmetro das fibras, a área e a espessura das matrizes foram avaliadas antes e após cada tratamento de esterilização em estudo. Após, realizou-se o estudo de adesão celular, através do uso de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical, utilizando DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) como marcador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os métodos foram eficazes quanto à esterilização, entretanto, todos levaram a algum tipo de alteração nos *scaffolds*. A radiação UV causou uma grande redução do peso molecular (Fig. 1). Essa queda foi maior com o aumento do tempo de exposição da fibra à radiação: 34,2%; 41,6% e 48,8% para 0,5; 1 e 2 horas, respectivamente. No entanto, a radiação UV não ocasionou mudanças aparente na morfologia das nanofibras e nas dimensões das matrizes (Fig. 2) (Tabela 1). O contrário ocorreu com o tratamento com etanol que, além de ocasionar uma forte alteração morfológica das fibras, levou a uma redução de até 47% do diâmetro da matriz (Fig. 2) (Tabela 1). A esterilização com solução antimicrobiana mostrou ser um método simples e eficaz para a descontaminação das matrizes. Essa técnica causou redução de peso molecular (27% para 1h de tratamento), porém consideravelmente inferior à redução causada pela radiação UV. Para os tempos de 1 e 2 horas, as alterações na morfologia das fibras, foram pouco pronunciadas. Além disso, as matrizes submetidas a esse tratamento apresentaram os melhores resultados no ensaio de adesão celular. As matrizes deixadas em contato durante 1h com a solução antimicrobiana foi a que apresentou o maior número médio de células-tronco aderidas: 26,67 células viáveis/campo ($p=0,043$) (Fig. 3).

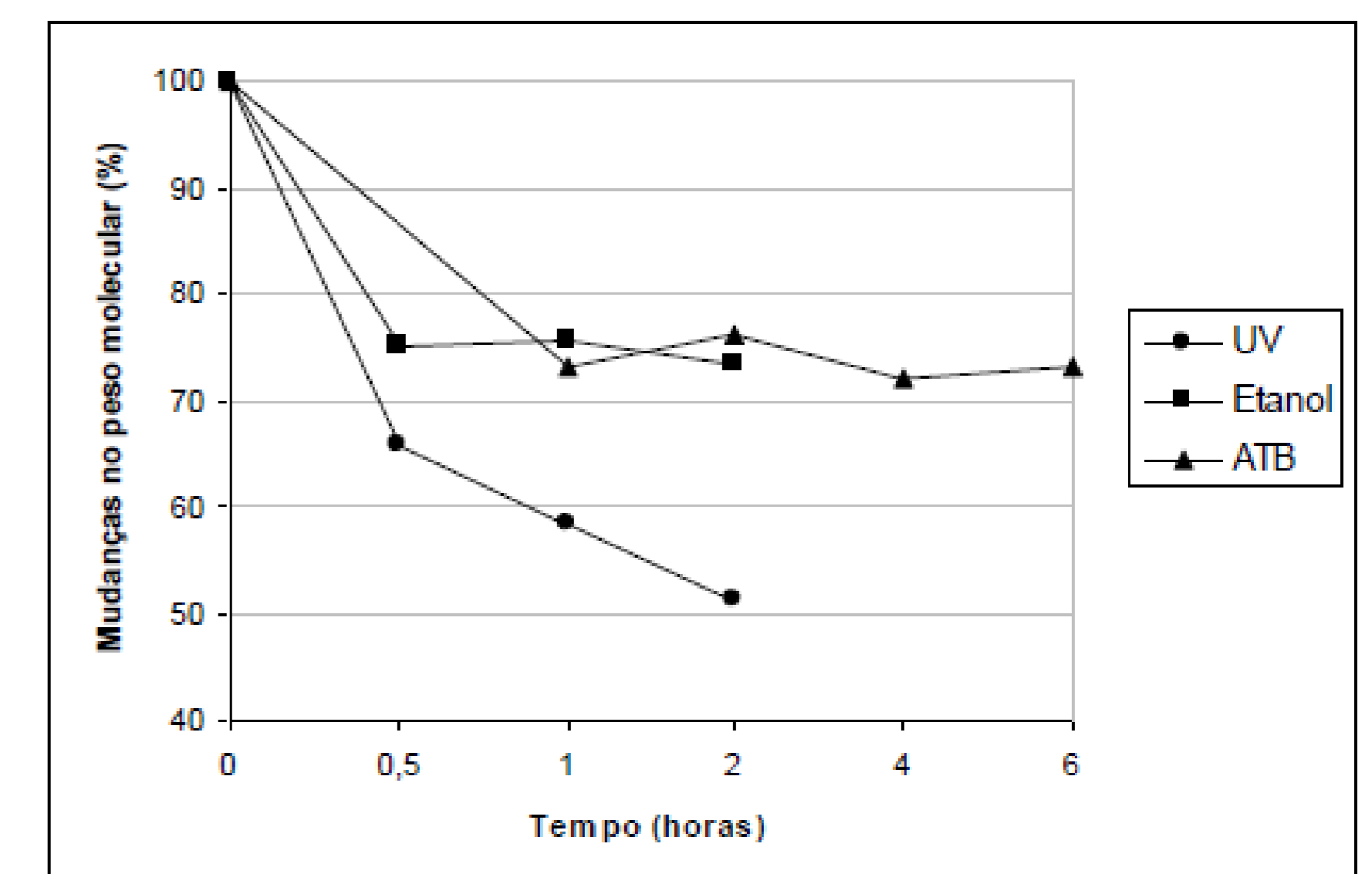


Figura 1: Mudanças no peso molecular do PLGA ocasionadas pelos tratamentos de esterilização em estudo

Tabela 1. Efeitos dos tratamentos de esterilização em estudo sobre as dimensões das matrizes

Tratamento	Tempo (h)	Mudança no diâmetro dos scaffolds	Mudança na espessura dos scaffolds
Ultravioleta	0,5	—	—
	1	—	—
	2	—	—
Etanol 70%	0,5	- 47%	+ 431%
	1	- 42%	+ 382%
	2	- 42%	+ 378%
Solução Antimicrobiana	1	- 27%	+ 150%
	2	- 25%	+ 152%
	4	- 20%	+ 141%
	6	- 28%	+ 174%

- indica redução da variável
+ indica aumento da variável
— indica que não houve variação da variável

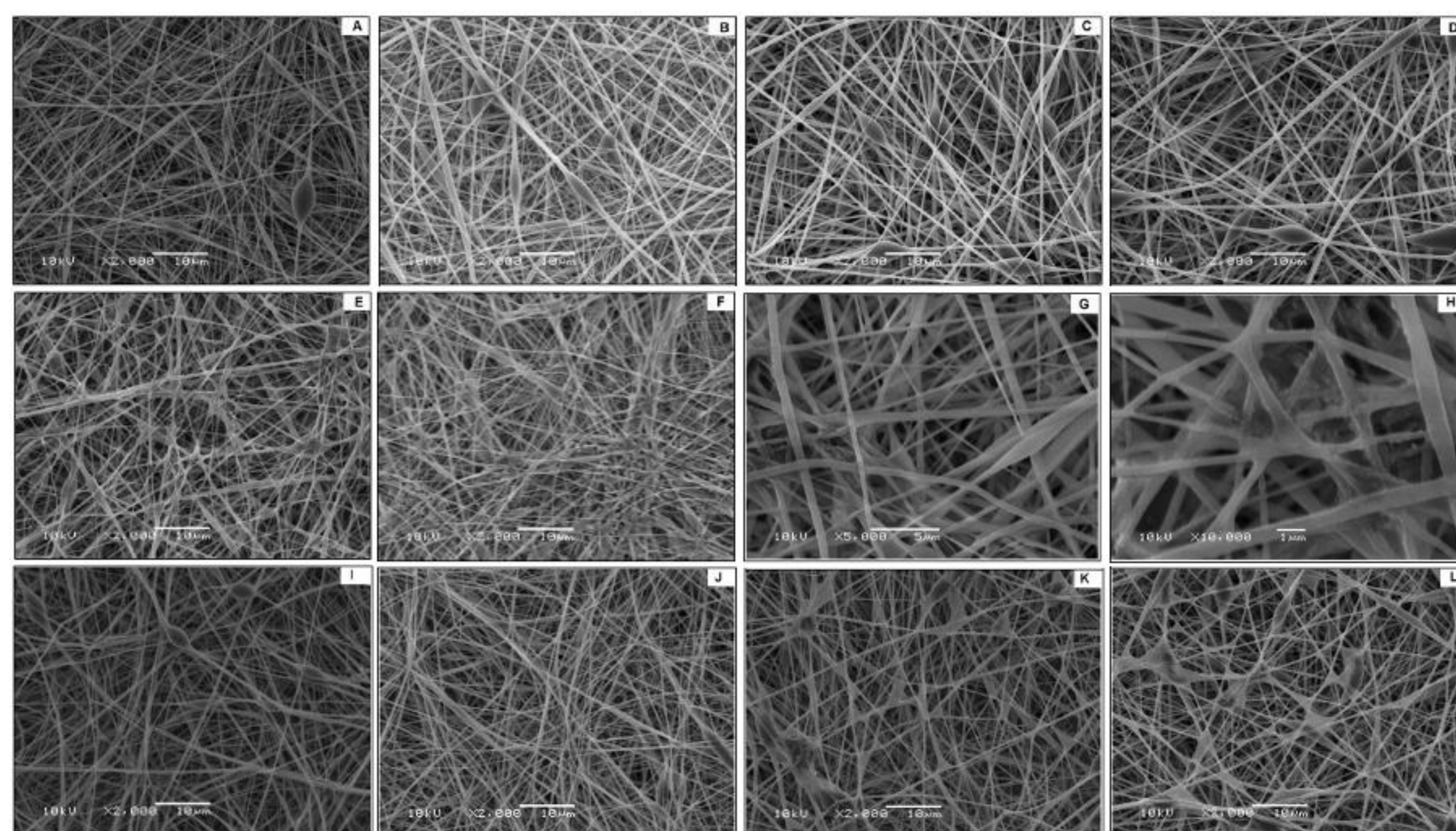


Figura 2. Imagens obtidas por MEV: (A) controle – matriz não estéril; (B) matriz esterilizada durante 30min com UV; (C) matriz esterilizada durante 1h com UV; (D) matriz esterilizada durante 2h com UV; (E) matriz esterilizada durante 30min com Etanol 70%; (F) matriz esterilizada durante 1h com Etanol 70%; (G, H) matriz esterilizada durante 2h com Etanol 70%; (I) matriz esterilizada durante 1h com solução antimicrobiana; (J) matriz esterilizada durante 2h com solução antimicrobiana; (K) matriz esterilizada durante 4h com solução antimicrobiana; (L) matriz esterilizada durante 6h com solução antimicrobiana;

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o tratamento com solução antimicrobiana é uma técnica simples e conveniente para a esterilização de nanofibras de PLGA.

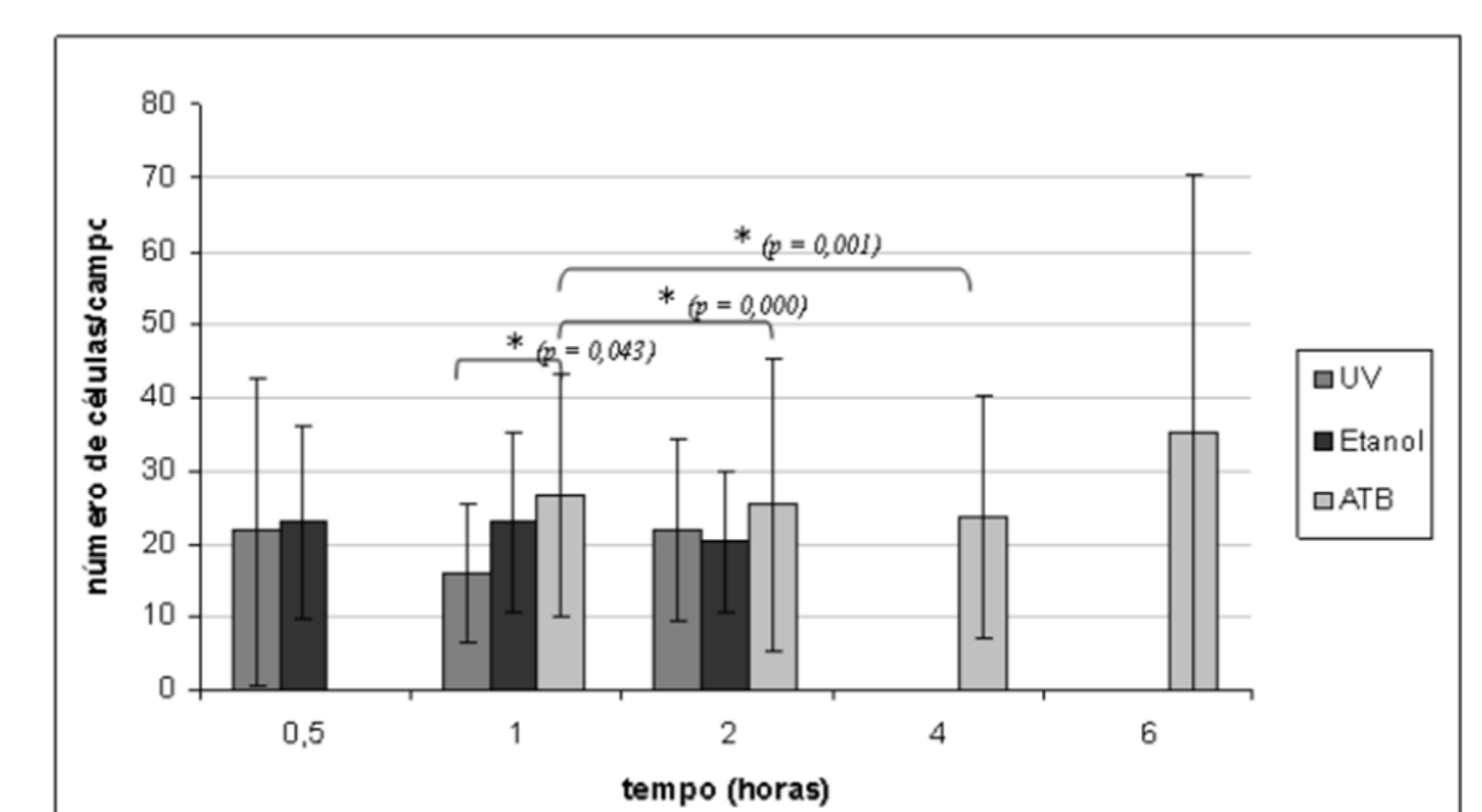


Figura 3: Influência dos diferentes tratamentos de esterilização sobre as matrizes de PLGA e adesão celular