

Avaliação da influência do tempo de incubação na adesão das células-tronco mesenquimais quando cultivadas em matrizes de nanofibras

Davi Silveira dos Santos¹; Kerlin Quintiliano¹; Thayane Crestani¹; Virginia Helfer¹; Daikelly Iglesias¹; Diogo André Pilger¹; Patricia Pranke^{1,2}
(davi.silveira@hotmail.com)

¹Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²Instituto de Pesquisa com Células-tronco; Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

A técnica de *electrospinning* mostra-se bastante eficiente para a produção de matrizes de fibras em escala nanométrica. Essas matrizes servem como suporte para a adesão de células-tronco (CT) em um ambiente que mimetiza a matriz extracelular, favorecendo a adesão e proliferação celular. Um dos principais métodos para avaliar a adesão das CT sobre as matrizes nanométricas é a coloração realizada com o 4,6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI). Essa análise consiste na identificação, por fluorescência, dos núcleos celulares com posterior contagem do número de células aderidas. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tempo de incubação das células-tronco mesenquimais (CTM) sobre as matrizes de Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) na adesão celular.

MATERIAIS e MÉTODOS

Três amostras de CTMs foram isoladas da polpa de dentes decíduos e utilizadas entre a 5^a e 7^a passagem da cultura celular. Foram produzidas amostras de matrizes de PLGA puro e PLGA contendo 0,2 % de Span 80 e 0,1% de albumina formando uma emulsão, tendo como finalidade a posterior incorporação de moléculas bioativas. A análise da adesão foi realizada para os tempos de 1, 2, 3, 6 e 8 e 10 horas de incubação nos dois grupos. Foram semeadas 3×10^4 células em cada matriz. Posteriormente aos tempos determinados, as matrizes foram lavadas para retirar as células não aderidas e os núcleos foram corados com DAPI e contados em microscópio invertido. As morfologias das fibras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

O diâmetro médio das fibras de PLGA/emulsão foi de 906 ± 157 nm e para PLGA puro foi de 970 ± 141 nm sem diferença estatística ($p=0,472$). Os núcleos das células avaliadas após os tempos de 1 e 2 horas de incubação apresentam-se mais arredondadas e menores em relação aos núcleos avaliadas após os tempos de 8h e 10h, sugerindo que os tempos de 1 e 2 horas não são suficientes para a completa adesão celular. A morfologia alongada dos núcleos sobre a superfície, observada nos tempos de 8 e 10 horas, corrobora com interpretação de maior adesão celular nesse período (Figura 2).

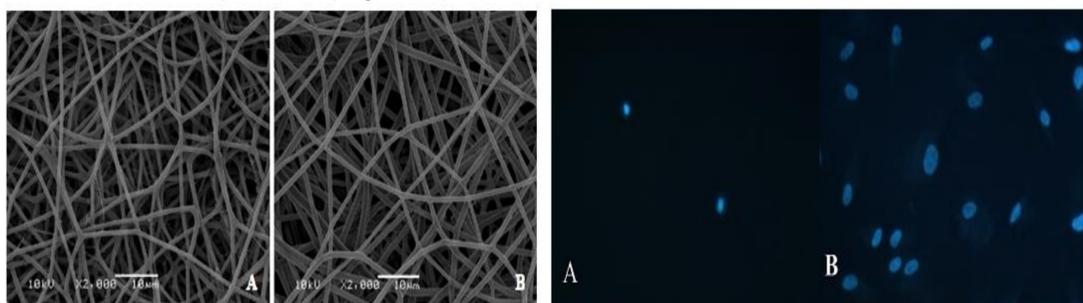


Figura 1: Micrografias (MEV) das matrizes de nanofibras – grupo PLGA/emulsão (A) e grupo PLGA puro (B).

Figura 2: Coloração do núcleo das células com DAPI. (A) morfologia nuclear após 1h de incubação e (B) morfologia nuclear após 10h de incubação. Visualização em aumento de 400x em microscopia de fluorescência.

Tanto para as matrizes de PLGA puro, como para as de PLGA com emulsão, a adesão após 1 hora mostrou-se significativamente inferior aos outros tempos, possuindo uma média de 1,4 células visualizadas por foto para o primeiro grupo e de 2,8 células/foto para o segundo grupo. Nas matrizes somente com PLGA, a adesão nos tempos de 2h e 3h foi significativamente menor quando comparados aos tempos de 6h, 8h e 10h (Figura 3). Nas matrizes de PLGA com emulsão, o melhor tempo de incubação foi o de 6 horas (Figura 4) com uma média de 33,5 células/foto em comparação com 17,7 e 20,5 de células/foto em 8 e 10 horas, respectivamente.

Adesão PLGA puro

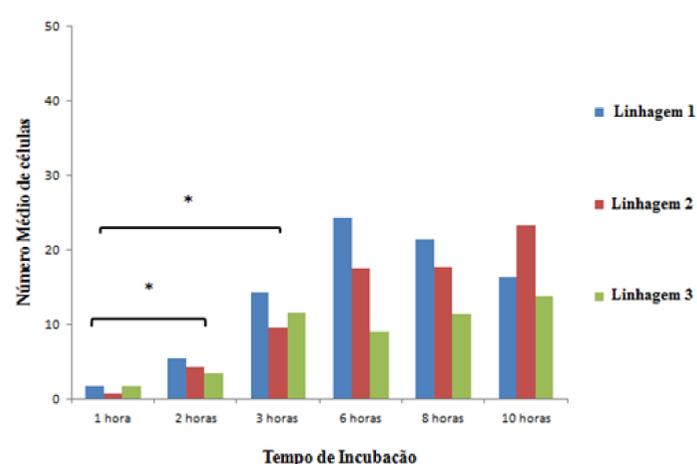


Figura 3: - Adesão celular em matrizes de PLGA puro nas três linhagens celulares. Legenda: * para $p < 0,05$

Adesão em PLGA/Emulsão

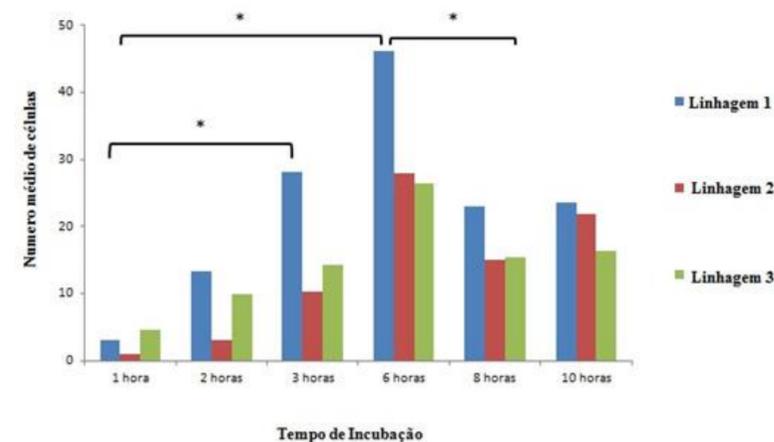


Figura 4: Adesão celular em matrizes PLGA/emulsão nas três linhagens celulares. Legenda: * para $p < 0,05$

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que as células necessitam de um tempo mínimo de 6 horas de incubação para obter uma boa adesão. Os resultados obtidos para PLGA/emulsão podem ser explicados por sua maior hidrofiliabilidade, conferida provavelmente pela emulsão, quando comparado ao grupo PLGA puro. Os resultados para PLGA puro estão de acordo com a literatura. A possibilidade de aumentar a adesão celular em matrizes com PLGA contendo emulsão é interessante visto que a incorporação de moléculas bioativas nestas matrizes objetiva a liberação lenta e controlada de fatores de crescimento que favoreçam a proliferação e diferenciação celular.