

ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS CULTIVADAS SOBRE MATRIZES DE NANOFIBRAS ALINHADAS.



CS - Ciências da Saúde

EDUARDO ÁLVARES BALBUENO¹, PATRICIA PRANKE^{1,2}

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

e-mail: eduardo.balbueno@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

O uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) na medicina regenerativa, principalmente quando associado ao sistema nervoso, requer alternativas em relação à via de aplicação. A associação da terapia celular com a nanotecnologia para uso em neurociências é uma abordagem inovadora no Brasil. O processo de regeneração do tecido nervoso pode ser melhorado através de características topográficas da superfície onde as CTMs são cultivadas. A associação dessas células com matrizes de nanofibras é uma estratégia para otimizar a regeneração tecidual, pois assegura a correta distribuição das CTMs, evitando que as células migrem para outros locais, melhorando, assim, sua capacidade proliferativa no local da lesão. Esse estudo teve como objetivo desenvolver matrizes com nanofibras alinhadas e analisar a capacidade de diferenciação neural das CTMs sobre essas estruturas tridimensionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção das matrizes de nanofibras

As matrizes de nanofibras foram obtidas através da técnica de *electrospinning*. A solução polimérica utilizada para a produção das nanofibras consistiu em PLGA - poli(ácido lactico-co-glicólico) (75:25) 15% em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol e albumina em PBS a 5%, formando a uma emulsão. As nanofibras alinhadas foram obtidas através do uso de um cilindro rotatório a 2.500 rpm (Fig. 1).

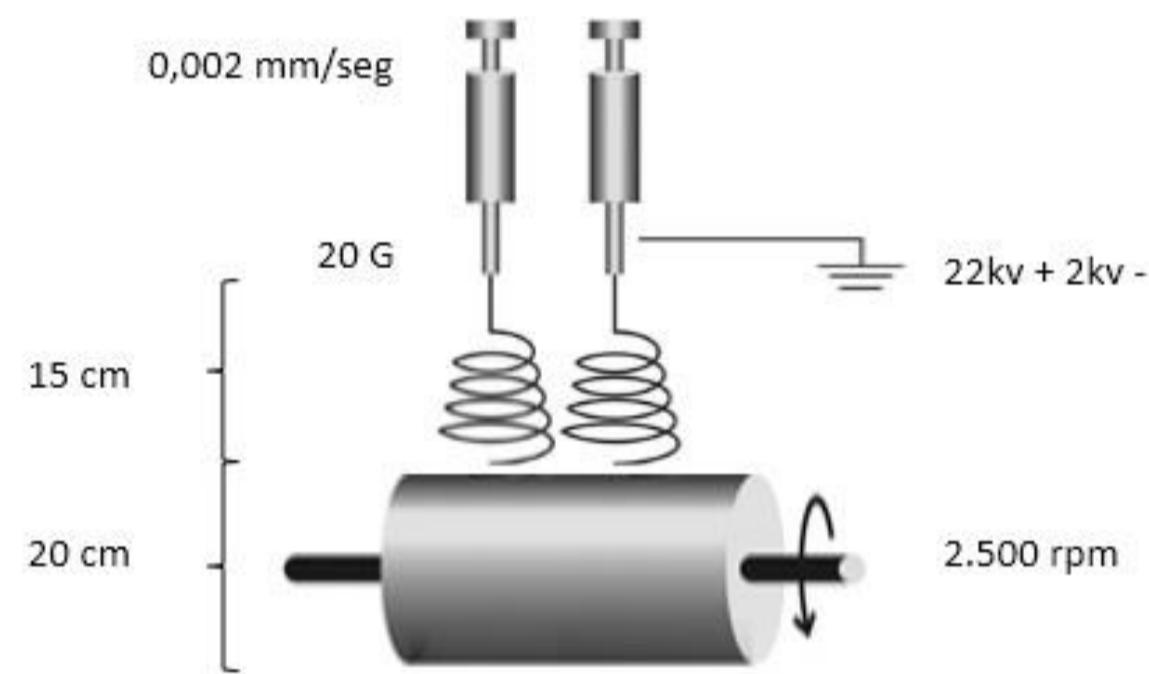


Figura 1. Produção das matrizes de nanofibras alinhadas pela técnica de *electrospinning*.

Isolamento, caracterização e cultivo das CTMs

As células foram isoladas a partir da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos, conforme protocolo padronizado pelo laboratório. As células foram caracterizadas como CTMs por sua capacidade aderente, diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica e perfil imunofenotípico. As CTMs foram cultivadas nas matrizes alinhadas, sobre a placa de cultura e foram submetidas à diferenciação neural através de protocolo estabelecido pelo laboratório. Quatro grupos foram estudados: Controle, onde as CTMs foram diretamente cultivadas na placa de cultivo com meio de cultivo convencional; Alinhadas Controle (AC), quando as CTMs foram semeadas nas matrizes com meio de cultivo convencional; Controle Diferenciado, quando as CTMs foram semeadas diretamente na placa com meio de indução neural; Alinhadas Controle Diferenciadas (ACD), contendo CTMs semeadas nas matrizes com meio de indução neural.

Diferenciação neural

A diferenciação neural foi avaliada através da análise da morfologia celular, da marcação por imunofluorescência e da expressão de genes neurais pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). As CTMs foram incubadas durante 21 dias em dois tipos de meios de cultura. O meio de cultura convencional (DMEM) continha substratos essenciais para a proliferação celular, como sais inorgânicos, vitaminas, aminoácidos, glicose. O meio de indução neural (Meio neurobasal A) continha substratos como aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, glicose em concentrações que forneciam condições para a diferenciação das CTMs em progenitores neurais. Os genes quantificados por RT-PCR foram a nestina, β III-tubulina, e enolase específica de neurônios (NSE). As amostras foram padronizadas com o gene GAPDH.

CONCLUSÕES

As matrizes constituídas por nanofibras alinhadas induzem a diferenciação neural das CTMs, mostrando a influência da topografia da matriz. Com isso, conclui-se que o biomaterial produzido pode ser utilizado como uma possível estratégia para otimizar a regeneração de lesões neurológicas.

RESULTADOS

Análise morfológica

Observou-se redução no número de células quando as mesmas foram submetidas a indução neural, tanto no grupo controle, quanto nas células aderidas à matriz. Tal achado corrobora com o fato que a diminuição da proliferação ocorreu devido a diferenciação celular. Mesmo assim, as CTMs cultivadas nas nanofibras, em meio convencional, mostraram um alongamento do citoesqueleto no mesmo sentido do alinhamento das matrizes. Por outro lado, o controle das células não diferenciadas apresentou aumento na proliferação e não mostrou uma morfologia semelhante a células neurais (Fig. 2).

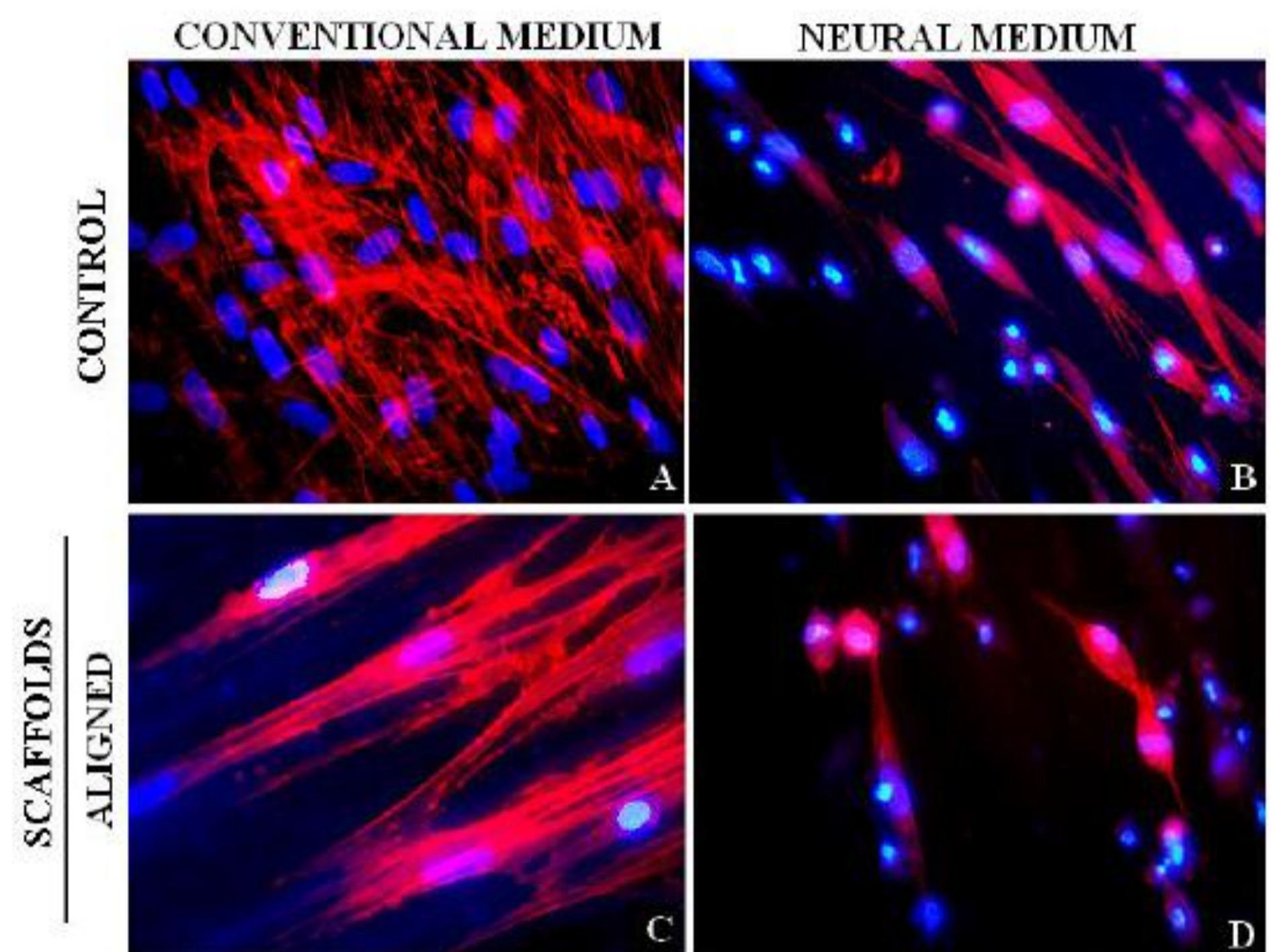


Figura 2. Morfologia das CTMs após 21 dias de cultura. Grupo controle em meio normal e meio de indução neural (A e B). Imagens representativas (C e D) em meio normal de cultivo e meio de indução neural das CTMs cultivadas nas matrizes.

Diferenciação neural

A avaliação da diferenciação neural das CTMs cultivadas sobre as matrizes foram capazes de promover o aumento da expressão genes neurais (Fig. 3). Para o gene nestina, um aumento similar na expressão gênica foi observado para as CTMs cultivadas sobre todos os grupos em relação ao controle. A expressão de β III-tubulina foi similar nos dois grupos diferenciados e maior em relação ao grupo controle. Já a expressão de NSE foi mais evidente quando as CTMs foram submetidas ao meio de indução neural.

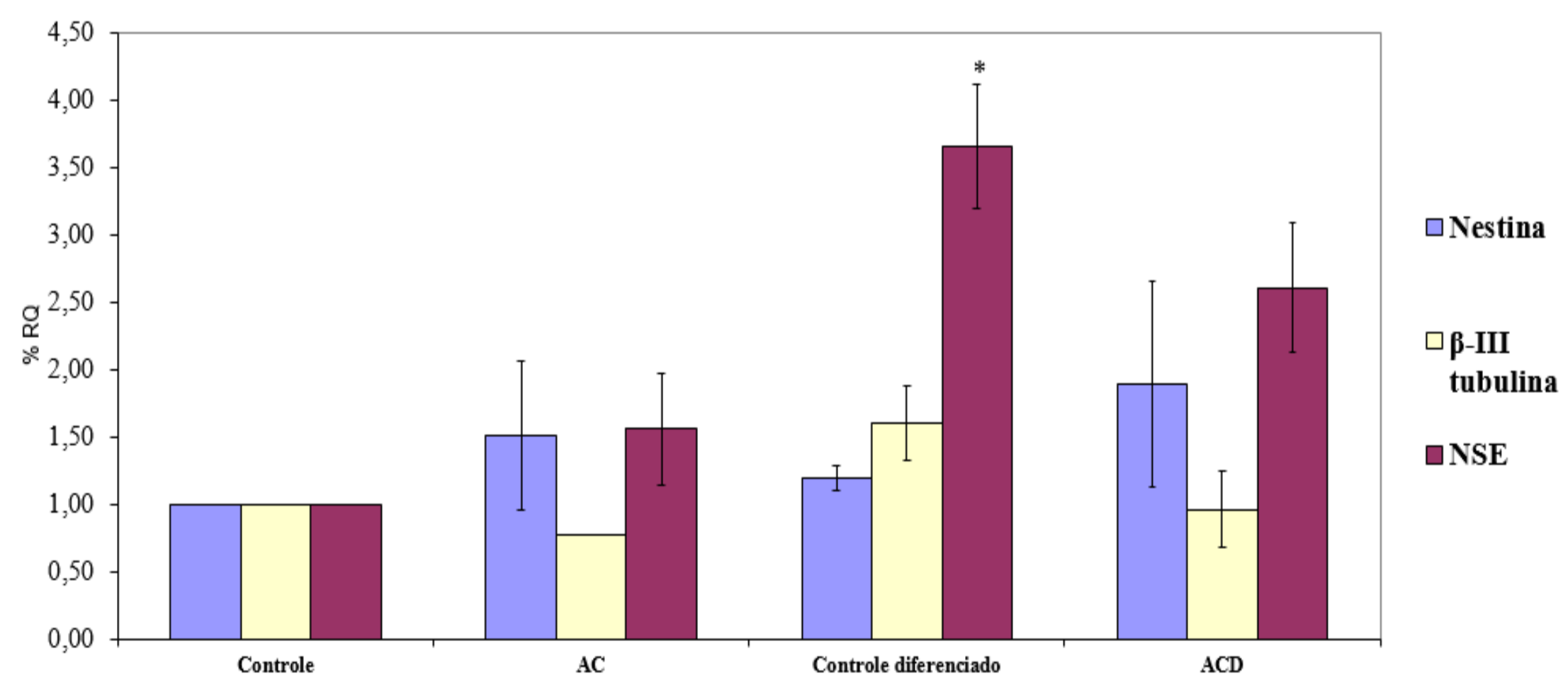


Figura 3. Expressão gênica das CTMs nas matrizes e nos grupos controle. RT-PCR analisa o total de RNA isolado de quatro amostras independentes expostos a meio de indução neural e meio de cultura normal.

Agradecimentos

Kerlin Quintiliano, Virginia Helfer, Davi Silveira, Thayane Crestani, Daikelly Iglesias e Gerson Xavier.

Apoio Financeiro



MODALIDADE DE BOLSA

BIC – UFRGS-REUNI