

PROPRIEDADES MECÂNICAS DO BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA UTILIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE CULTURAS TRIDIMENSIONAIS DE ASTRÓCITOS E CULTURAS MISTAS

Thaís Alves Tinée; Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa²

¹Estudante do Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas- DB – UFRPE;E-mail: thaís_tinee@gmail.com; ²Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia – CCB – UFPE. E-mail: belmira@gmail.com

Sumário: O biopolímero da cana de açúcar é um exopolissacarídeo obtido a partir da bactéria *Zooglea* sp com potencial uso em bioengenharia de tecidos. No presente estudo analisamos as suas propriedades mecânicas e testamos a viabilidade do mesmo para obtenção de culturas tridimensionais de astrócitos e de culturas mistas de neurônios e glia do córtex cerebral de ratos.

Palavras-chaves: astrócitos; biopolímero; biotecnologia; neurônios

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos tem como principal alvo a produção de matrizes tridimensionais, capazes de mimetizar o sistema fisiológico *in vitro* ou *in situ*. Dessa forma, a criação de materiais biodegradáveis, assim como biocompatíveis tem sido bastante estimulada na ciência atual (SUBRAMANIAN; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2009). Biopolímeros podem ser obtidos a partir de matéria orgânica muitas vezes oriunda de plantas comerciais, tais como cana-de-açúcar, milho, girassol ou qualquer outra oleaginosa (PRADELLA, 2006). Neste cenário, o biopolímero produzido a partir do melão da cana-de-açúcar por ação da bactéria *Zooglea* sp vem ganhando especial atenção pela sua potencialidade de uso em ensaios biomédicos, incluindo a sua aplicação como substituto da dura mater em ratos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as propriedades mecânicas do biopolímero e sua possível utilização para cultura tridimensional de astrócitos e neurônios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Propriedades mecânicas do biopolímero de cana-de-açúcar

As propriedades mecânicas, incluindo cargas máxima (N), a resistência à tração (tensão, MPa) e alongamento (deformação, %) das membranas do biopolímero (previamente umedecido com álcool isopropílico) foram avaliadas através da realização de um ensaio de tração padronizado em uma Máquina Mecânica Universal de Teste (EMIC, modelo DL 500 MF), com uma distância de folga de 2,5 cm, velocidade de 250 mm/min. O stress foi calculado como F/A , onde F é a força de carga e A é a área da secção transversal dos materiais. A deformação foi calculada considerando DL/L , em que L é o comprimento inicial e DL é a diferença entre os comprimentos na ruptura e o comprimento inicial. As amostras ($n = 10$) foram cortadas em pedaços de ensaio, cada 2cm x 7cm. Um paquímetro digital (Mitutoyo Série 342, Japão; resolução: 0,001 milímetros; Graduação: 0,01 milímetros) foi utilizado para medir a espessura antes de colocar as amostras na máquina de teste.

Aquisição dos animais, acasalamento para obtenção dos filhotes e obtenção do biopolímero Os animais foram obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, mantidos sob dieta comercial balanceada (Labina) e água *ad*

libtum com idade entre P0 e P3 (P0 = dia de nascimento). O biopolímero da cana-de-açúcar foi fornecido pela Polisa® através do Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar do Depto. de Cirurgia da UFPE.

Culturas mistas de neurônios e astrócitos de córtex cerebral de ratos

As culturas mistas de astrócitos e neurônios foram obtidas a partir do córtex cerebral de ratos neonatos (P0-P3). Após a dissecação, o tecido foi mecanicamente dissociado com micropipeta. Após a centrifugação das células em suspensão (1500 rpm/5 min) o sobrenadante foi desprezado e ao 'pellet' foram adicionados 3 ml de meio DMEM-F12 (Gibco) complementado com glicose (33 mM), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina/estreptomicina (0,5 mg/ml) e fungizona (2,5 µg/ml). As culturas foram mantidas inicialmente por 2 dias, em meio DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB) a 37°C e 5% de CO₂. A partir do segundo dia foi acrescentado meio Neurobasal + suplemento B27 para a manutenção dos neurônios. Tal meio foi trocado a cada 2 dias até o oitavo dia onde se teve uma boa confluência tanto das células neuronais quanto das células astrocitárias

Culturas de astrócitos de substância nigra em matriz tridimensional

As culturas primárias de astrócitos da substância nigra foram preparadas a partir de ratos neonatos (P0-P3). O tecido foi dissociado com micropipeta. Após a centrifugação das células em suspensão (1500 rpm/5 min) o sobrenadante foi desprezado e ao 'pellet' foram adicionados 3 ml de meio DMEM-F12 (Gibco) como descrito acima para as culturas mistas. No entanto, as células foram sempre mantidas no meio DMEM-F12.

Imunocitoquímica das culturas

A presença dos neurônios nas culturas mistas foi evidenciada a partir de imunocitoquímica para marcação de núcleo neuronal utilizando-se o anticorpo anti-neu-N e para os astrócitos, o marcador foi o filamento intermediário GFAP. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 20 min, seguida de lavagem com tampão tris+ triton X100 (TBS-T). Após isso, as células foram bloqueadas com solução de bloqueio (TBS-T + 0,3% BSA a 3% + 10% FBS) por 1 h, a temperatura ambiente. Depois do bloqueio, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários. No dia seguinte, foi feita a incubação no anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho da Vector. A visualização do antígeno foi feita utilizando-se Diaminobenzidina como cromógeno. As células foram observadas em microscópio óptico invertido trinocular acoplado a uma câmera Moticam.

RESULTADOS

Tabela 1. Espessura e propriedades mecânicas do biopolímero de cana-de-açúcar

Amostras	Espessura (µm)	Força máxima(N)	Tensão máxima(MPa)	Deformação (%)	Módulo elástico(MPa)
1	90	29.89	15.82	4.02	409.6
2	85	114.80	60.71	9.52	801.4
3	70	31.36	16.59	4.23	450.5
4	70	24.50	12.96	3.22	437.9
5	80	25.29	11.71	3.59	203.4
6	70	33.29	15.41	3.40	489.9
7	75	33.17	15.35	6.30	402.6
8	75	30.84	14.28	5.43	376.1
9	75	37.95	18.74	5.29	303.4
10	75	26.42	13.05	7.74	266.9
11	95	32.90	16.25	6.16	340.9
12	80	31.28	15.45	5.42	314.4
Mean	78.33	30.7	14.97	5.07	358.60
SD	8.07	4.17	2.05	1.46	89.45

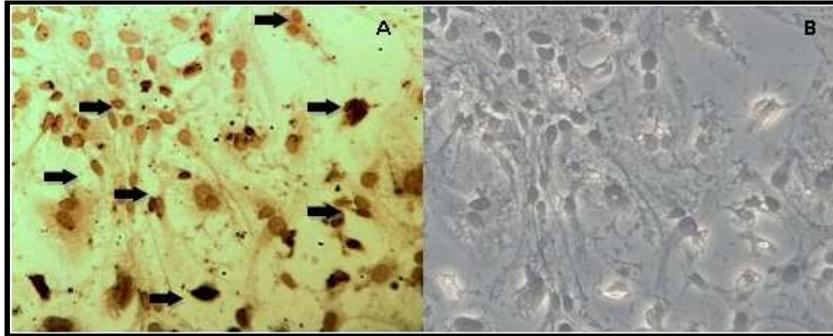


Figura 1. Fotomicrografia de cultura mista de astrócitos e neurônios sobre poliestireno em (A) e com (B) contraste de fase. A marcação para neurônios imunorreativos à proteína neu-n. Neurônios são mostrados nas setas em preto.

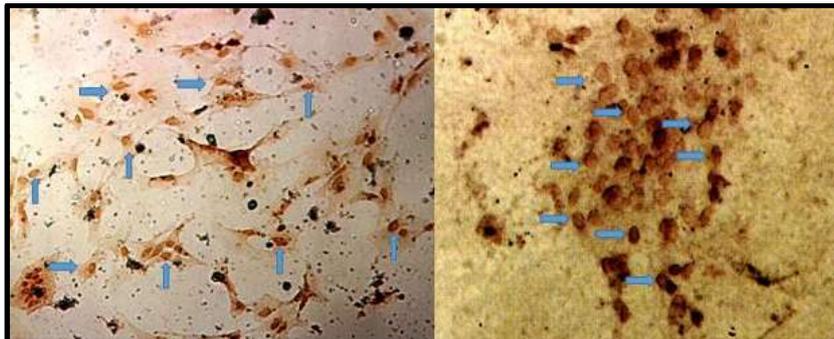


Figura 2. Fotomicrografia de cultura mista de astrócitos e neurônios sobre poliestireno (A) e sobre biopolímero da cana de açúcar (B) evidenciando a marcação para neurônios imunorreativos à proteína neu-N. Neurônios são mostrados nas setas em azul. Observar a adequada adesão dos neurônios sobre o biopolímero nesta preparação de cultura mista.

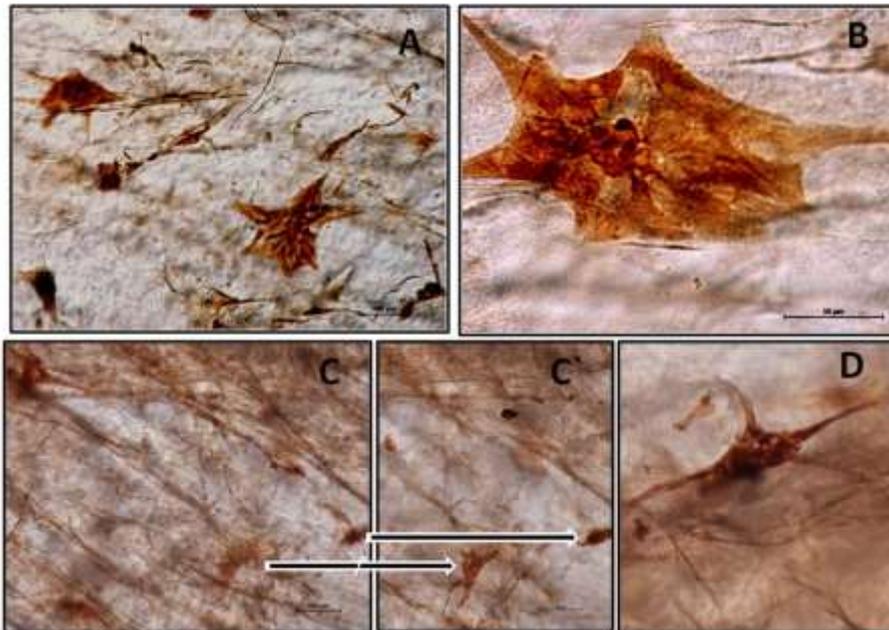


Figura 3. Fotomicrografia de cultura tridimensional de astrócitos da substância nigra evidenciando imunorreatividade à proteína de filamento intermediário GFAP. Em C e C' as setas indicam células com foco em diferentes profundidades na cultura 3D em esponjas do biopolímero da cana de açúcar. Em D observar o formato 3D dos astrócitos.

DISCUSSÃO

O biopolímero apresenta propriedades mecânicas satisfatórias, em função dos valores em relação a variável deformação e módulo elástico, indicando uma maior resistência deste biomaterial à ação, diminuindo sua fragilidade, assim como afirmam Engelberg e Kohn (1990), sendo estas duas características importantes ainda para a tenacidade e ductilidade do biomaterial, auxiliando ainda na energia de absorção (KUNDU, 2013). Além disso, as propriedades do mesmo permitiram a realização de culturas tridimensionais de astrócitos bem como co-culturas de neurônio e astrócitos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo suportam a hipótese de que o biopolímero da cana de açúcar poderá ser usado para obtenção de microfatias funcionais do sistema nervoso.

AGRADECIMENTOS

À UFRPE pela oportunidade estudantil, à UFPE, assim como ao CNPq pela concessão da bolsa, ao professor José Lamartine pela aquisição do biopolímero. A todos do laboratório pela amizade e ajuda constante. À CAPES (Procad NF-2009), FACEPE (APQ 0036-2.07/11) e ao Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT no. 573604/2008-8)

REFERÊNCIAS

- PRADELLA, C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. [s.l: s.n.].
- LIMA, F. M. T; Sugar cane biopolymer membrane as dura mater substitute in wistar rat, Thesis, 2008.
- SUBRAMANIAN, A.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. **Journal of biomedical science**, v. 16, p. 108, 2009.
- YANG, F. et al. Characterization of neural stem cells on electrospun poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffold. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 15, n. 12, p. 1483–1497, 2004.