

INVESTIGAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS SOBRE ARCABOUÇOS A BASE DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Paulo Henrique Cavalcanti de Araújo¹; Paloma Lys de Medeiros²

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB - UFPE. E-mail: paulohenriquecaraujo@gmail.com

²Docente/pesquisador do Dept^o. de Histologia e Embriologia - CCB - UFPE. E-mail: pmedlys@gmail.com

Sumário: A bioengenharia busca o desenvolvimento de técnicas que proporcionem a regeneração de estruturas como pele, ossos e cartilagens através da cultura de células em suportes tridimensionais. Células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes linhagens e, se associadas a um biomaterial, podem se tornar importantes ferramentas para o tratamento de lesões epiteliais. Objetivou-se avaliar as características morfológicas de CTMs e sua capacidade de diferenciação em queratinócitos quando cultivadas sobre membranas (lisas e porosas) do biopolímero de cana-de-açúcar (BCA). Cordões umbilicais (n=20) foram doados mediante aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº. 482/2010). As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino e mistura de antibióticos, sob ação de indutores para a diferenciação em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de umidade controlada. A imunofenotipagem foi realizada com citometria de fluxo. Avaliou-se a biocompatibilidade celular das biomembranas através das microscopias invertida com contraste de fase e eletrônica de varredura (MEV). A diferenciação das CTMs em queratinócitos ocorreu em ambos os suportes, assim como em garrafas sem o biopolímero. O BCA foi capaz de manter o desenvolvimento e a diferenciação das CTMs do cordão umbilical em queratinócitos.

Palavras-chave: biopolímero de cana-de-açúcar; células-tronco mesenquimais; diferenciação celular; queratinócitos;

INTRODUÇÃO

A Engenharia Tecidual é considerada uma ciência multidisciplinar que busca aprimorar ou desenvolver novos biomateriais capazes de auxiliar os métodos tradicionais de reparo tecidual. A cultura de células-tronco e sua possível aplicabilidade terapêutica têm reforçado o interesse por novas ferramentas terapêuticas que sejam capazes de possibilitar uma melhor recuperação de estruturas cartilagenosas, ossos, componentes cardiovasculares e pele (MALEKZADEH et al., 1998; FRESHNEY, et al., 1999; GRIFFITH & NAUGHTON, 2002). Nesse contexto, as lesões cutâneas destacam-se pelo fato de que o rompimento da barreira epidérmica predispõe o paciente à infecções, aumento da perda insensível de água e eletrólitos, provocando hipotermia e elevação da morbidade, bem como aumento nos custos com internamentos prolongados. Na atualidade, os métodos cirúrgicos tradicionais para o reparo de lesões epiteliais como os implantes cutâneos (autoenxerto, aloenxertos e xenoenxertos) apresentam algumas dificuldades como, por exemplo, a escassez de áreas doadoras cutâneas. Essa realidade impulsiona a criação de novas alternativas direcionadas para os substitutos epidérmicos a partir do desenvolvimento científico da engenharia de tecidos. (FERREIRA et al., 2011). As CTMs se associadas a um biomaterial, como o biopolímero de cana-de-açúcar (BCA), podem se tornar importantes ferramentas para o tratamento de lesões relacionadas ao Sistema Tegumentar. Neste estudo, objetivou-se avaliar as características morfológicas de CTMs e

sua capacidade de diferenciação em queratinócitos quando cultivadas sobre membranas (lisas e porosas) do biopolímero de cana-de-açúcar.

MATERIAIS E MÉTODOS

As membranas do biopolímero de cana-de-açúcar foram produzidas a partir da fermentação do melão através da bactéria *Zoogleae sp.* e gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa Biopolímeros de Cana-de-Açúcar, coordenado pelo Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar, do Programa de Pós-graduação em Cirurgia do Hospital das Clínicas-CCS/UFPE. Cordões umbilicais foram doados por puérperas conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco - CEP/CCS/UFPE (Protocolo no. 482/2010). As veias dos cordões umbilicais humanos foram preenchidas com colagenase tipo IV (Sigma®) para a extração das CTMs. Após esse procedimento, as células foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com Soro Fetal Bovino e antibióticos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após um período de 10 dias, observou-se confluência celular (80%). A confirmação da linhagem mesenquimal ocorreu através da citometria de fluxo (FACScalibur BD®) e foram utilizados marcadores de superfície específicos para confirmação da linhagem mesenquimal (CD 29, CD 44 e CD 90) e marcadores da linhagem hematopoiética (CD 31, CD 34 e CD 45). Após a obtenção da 3ª passagem das CTMs, avaliou-se a biocompatibilidade com as membranas (lisas e porosas) através de microscopia invertida com contraste de fase (LEICA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A diferenciação queratinocítica foi realizada sem a presença do biomaterial; assim como também foi realizada nas membranas lisas e porosas com o meio indutor (Stemline™ Keratinocyte Medium II – Sigma-Aldrich®).

RESULTADOS

Logo após a extração das células da veia do cordão umbilical, foram observadas células com formato arredondado. A formação da monocamada ocorreu após cinco dias de cultivo. A confluência celular de aproximadamente 80% foi observada em torno de dez dias de cultura (**Figuras 1, 2 e 3, respectivamente**).

A análise imunofenotípica deste estudo (**Tabela 1**) revelou expressão positiva para marcadores moleculares de superfície (CD 29, CD 44 e CD 90). Obteve-se expressão negativa para marcadores típicos de linhagens hematopoiéticas e endoteliais (CD 31, CD 34 e CD 45).

Tabela 1. Representação dos resultados da citometria de fluxo, na qual se observa a expressão de marcadores de superfície de CTMs de cordão umbilical humano. Os dados mostrados são do fenótipo de células analisadas no final da 3ª passagem (ARAÚJO et al, 2014).

<i>Clusters of Differentiation (CDs)</i>		
Expressão positiva	Fenótipo	Referências
CD29	Molécula de adesão das superfamílias das integrinas	SPRINGER, 1990
CD44	Receptor de hialuronato	BROWN, 1991
CD90	Molécula de adesão responsável pela interação célula-célula e matriz celular	CRAIG, 1993
Expressão negativa	Fenótipo	Referências
CD31	PECAM-1 molécula de adesão plaquetária	ALBELDA, 1991
CD34	Receptor presente em progenitores hematopoiéticos e células endoteliais	SILVESTRI, 1993
CD45	Presente em todas as células hematopoiéticas	LOKEN, 1990

A morfologia de CTMs do cordão umbilical humano sobre membranas lisas e porosas do biopolímero de cana-de-açúcar revelou crescimento de colônias celulares, nas quais as

células apresentaram formato variando de arredondadas a fibroblastóides e evidente biocompatibilidade (80-90 %) em função do processo de confluência estabelecido por volta de dez dias (**Figuras 3 e 4**, respectivamente). A avaliação da interação das células-tronco mesenquimais com o biomaterial por meio da MEV revelou variados formatos das CTMs. Observamos ainda que as CTMs projetam finas conexões citoplasmáticas (nanofibras) em direção à malha do biopolímero de cana-de-açúcar, permitindo sua ancoragem no biosuporte e a comunicação com as células adjacentes (**Figura 5**). A diferenciação de CTMs em garrafas de cultura na ausência do biopolímero revelou células com aspecto fibroblastóide com a tendência à formação de agrupamentos celulares. Após o período de 21 dias, evidencia-se tramas de células confluentes (**Figura 6**). Características morfológicas semelhantes foram observadas na diferenciação das CTMs em queratinócitos sobre as biomembranas (**Figura 7**). A microscopia eletrônica de varredura das CTMs diferenciadas em queratinócitos sobre as biomembranas foi realizada após o período de 21 dias e possibilitou a visualização de células num estágio avançado da diferenciação. A MEV proporcionou a observação da interação citoplasmática por meio de filapódios em contato com as fibras do biomaterial, reforçando o conceito de que as CTMs são capazes de aderir, crescer e se diferenciar sobre as biomembranas (**Figura 8**).

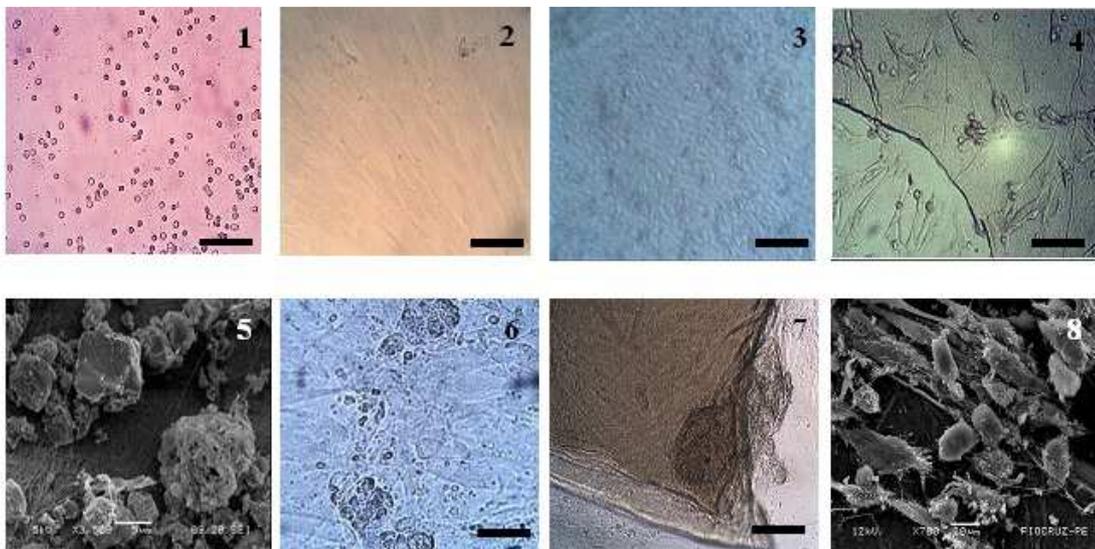


Figura 2. Fotomicrografias e eletromicrografias da cultura de CTMs de cordão umbilical humano sobre as biomembranas (lisas e porosas) do biopolímero de cana-de-açúcar. **1)** observa-se células com formato arredondado logo após a extração da veia do cordão umbilical humano. **2)** após dez dias de cultura, é possível observar células em processo de confluência (aproximadamente 80%). **3)** nota-se células com morfologia fibroblastóide em processo de confluência sobre a biomembrana lisa. **4)** Confluência celular sobre a biomembrana porosa. **5)** Extensões citoplasmáticas das CTMs em direção à membrana registradas por meio da MEV. **6)** Área evidenciando agrupamentos celulares de CTMs diferenciadas em queratinócitos sem a presença do BCA. **7)** observa-se uma trama de CTMs diferenciadas em queratinócitos sobre a biomembrana. **8)** é possível observar com maiores detalhes o crescimento, empilhamento e a ancoragem de queratinócitos sobre o biomaterial. Escala de barra = 200 μm (1, 2, 3 e 4), 100 μm (6 e 7), 20 μm (5) e 5 μm (8).

DISCUSSÃO

A adesão das CTMs às biomembranas revelou um dos principais requisitos destacados por Pertile et al (2007), demonstrando a necessidade de um biomaterial ser capaz de permitir a formação de uma ligação sólida e biocompatível com as células, proporcionando a interação de proteínas da membrana celular com o biosuporte por meio da emissão de filapódios, que garantem a adequada ancoragem das células ao biomaterial. Nesse estudo, é possível destacar os resultados satisfatórios quanto ao processo de biocompatibilidade das células-tronco mesenquimais (CTMs) do cordão umbilical humano com as membranas

lisas e porosas do BCA. Esses achados corroboram com os dados descritos por Barros (2013) que reforçou o uso do BCA como um novo suporte para a cultura de CTMs. De forma semelhante, Araújo et al (2014) sugeriram a potencial capacidade desse novo biomaterial de proporcionar um ambiente favorável à diferenciação das CTMs em queratinócitos. No decorrer da nossa avaliação, ficou evidente tais características, destacadas pelas análises a partir da microscopia eletrônica de varredura, que proporcionou uma riqueza de detalhes nessa investigação.

CONCLUSÕES

O biosuporte estudado nas formas de membranas lisas e porosas do biopolímero de cana-de-açúcar mostrou-se biocompatível e capaz de proporcionar o desenvolvimento das células-tronco mesenquimais (CTMs) oriundas do cordão umbilical humano. As biomembranas favoreceram um ambiente propício para o processo de diferenciação das CTMs em queratinócitos. Dessa forma, faz-se necessário intensificar os estudos com polímeros direcionados para a bioengenharia a fim de contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas para a regeneração tecidual.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/UFPE) e ao CNPq; À Prof^a. Dra. Márcia Bezerra da Silva do Departamento de Biofísica e Radiobiologia-CCB/UFPE e ao Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar pelo fornecimento do biopolímero.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, P.H.C. de; DIAS, M.R.P.; AGUIAR, J.L. de A.; SILVA, M.B. da; SILVA, E.C. da; MEDEIROS, P.L. de. Diferenciação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em queratinócitos sobre biomembranas de cana-de-açúcar, **Rev. Enf. Atual In Derme**, v. 68, n. 6, p. 18-21, 2014.
- FERREIRA, M.C.; PAGGIARO, A.O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA NETO, N.; SANTOS, G.B. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.
- BARROS, BARROS, L.A. Aspectos morfofuncionais de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano cultivadas sobre matrizes tridimensionais de biopolímero de cana-de-açúcar, **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE, pp. 76, 2013.
- FRESHNEY, R.I., Freshney's Culture of Animals Cells: A Multimedia Guide. **General Textbooks and Relevant Journals**, Willy-Liss. 1999.
- GRIFFITH, L. G. & NAUGHTON, G. Tissue Engineering- Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009. 2002.
- MALEKZADEH, R.; HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.; ADAMS, D.F.; McALLISTER, B. S. Isolation of human osteoblasts-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **J. Periodontol.**, v. 69, p.1256-1262, 1998.
- PÉRTILE, R. A. N., SIQUEIRA JR, J. M., RAMBO, C. R., BERTI, F. V., DO VALLE, R. M. R., PORTO, L. M. Interação de culturas celulares com suportes biopoliméricos para aplicações biomédicas. **Exact.**, v. 5, n. 2, p. 343-352, 2007.