

AUMENTO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO APÓS TRATAMENTO COM VIDRO BIOATIVO DERIVADO DO PROCESSO SOL-GEL

MARINA M. M. BRIÃO^{1, 2}; TAYNARA MEIRELLES²; NATASHA MAURMANN²;
RENATO LUIZ SIQUEIRA³; EDGAR D. ZANOTTO³; PATRICIA PRANKE^{2, 4, 5}

¹Universidade Federal de Pelotas – marinabriao@gmail.com (MMMB)

²Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS – taymeirelles@yahoo.com.br (TM); natasha.maurmann@ufrgs.br (NM)

³Laboratório de Materiais Vítreatos, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil – rastofix@gmail.com (RLS); dedz@ufscar.br (EDZ)

⁴Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁵Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre, RS, Brasil - patriciapranke@ufrgs.br (PP)

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muito tem sido pesquisado sobre a relação da engenharia tecidual com a área da saúde, cujo objetivo visa construir substitutos biotecnológicos para órgãos ou tecidos danificados. Com isso, busca-se prover condições ótimas para o processo de regeneração, além de proporcionar modelos *in vitro* para pesquisa e desenvolvimento (BERTHIAUME *et al*, 2011). As células-tronco mesenquimais (CTMs) apresentam a capacidade de autorrenovação, diferenciação e altas taxas de proliferação. Por sua facilidade de obtenção e características promissoras de empregabilidade, as células-tronco advindas de dentes têm sido amplamente estudadas e aplicadas, principalmente no âmbito da odontologia e regeneração óssea (CHALISSERRY *et al*, 2017). Dessa forma, o emprego da engenharia tecidual atrelada à utilização de células-tronco tem a capacidade de potencializar as condições regenerativas de técnicas como a terapia celular, visto que no processo convencional há um grande escape das células para sítios não lesados, o que afeta o potencial de regeneração do procedimento. Somado a isso, os biovidros são materiais sintéticos com propriedades bioativas, configurando excelentes candidatos no que concerne à engenharia tecidual por sua capacidade de integrar-se à matriz óssea. Dessa forma, o presente trabalho objetivou testar o comportamento de células-tronco mesenquimais quando cultivadas com biovidros como biomateriais, para uso futuro na medicina regenerativa.

2. METODOLOGIA

Para o estudo, foi utilizado um biovidro derivado do processo sol-gel composto por 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅ (% em mol), conforme descrito por SIQUEIRA e colaboradores (2017). As CTMs foram obtidas da polpa de dentes decíduos humanos de pacientes da Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo próprio paciente ou seu responsável e aprovação no Comitê de Ética (Registro na comissão de ética na Plataforma Brasil N° 36403514.6.0000.5347). As células foram mantidas em meio DMEM Low Glucose, pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em incubadora umidificada com teor de 5% de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e as células foram sub-cultivadas de acordo com a confluência nos frascos de cultivo utilizando 0,05% de tripsina/EDTA. As CTMs foram caracterizadas por meio da morfologia, aderência ao plástico, citometria de fluxo e verificação de capacidade

de diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica (DOMINICI *et al*, 2006). Para o experimento, as células foram semeadas a uma densidade de 7.000 células por poço em uma placa de cultura de 96 poços e tratadas com as concentrações elencadas de 0 (controle); 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg/mL do biovidro após 24 h de cultivo. A fim de analisar a viabilidade celular das CTMs em contato com o biovidro, foi utilizado o reagente colorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), cuja redução em cristais de formazan, que ocorre em mitocôndrias de células viáveis, possibilita contabilizar a viabilidade celular por meio de espectrofotometria. Após um período de 4 horas de incubação, os cristais foram dissolvidos com 200µL de DMSO (dimetilsulfóxido), homogeneizados e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro Multiskan™ FC nos comprimentos de onda de 630 e 570 nm, a partir dos quais uma média foi estabelecida e considerada para avaliação. Os resultados foram expressos como a média normalizada da viabilidade em porcentagem (%) $\pm$ erro padrão da média e avaliados utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Diferenças estatísticas significativas foram estabelecidas com $p < 0,05$. Os dados foram analisados com o *software* BioEstat 5.0. Ademais, a morfologia dos biomateriais foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio Zeiss Evo 50 (Carl-Zeiss). Para isso, o biomaterial foi metalizado utilizando uma fina camada de platina e submetido à aceleração de voltagem de 10 kV e ampliação de 1.000-20.000x para obtenção das imagens.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aspecto geral das partículas do biovidro pode ser visualizado na Figura 1.

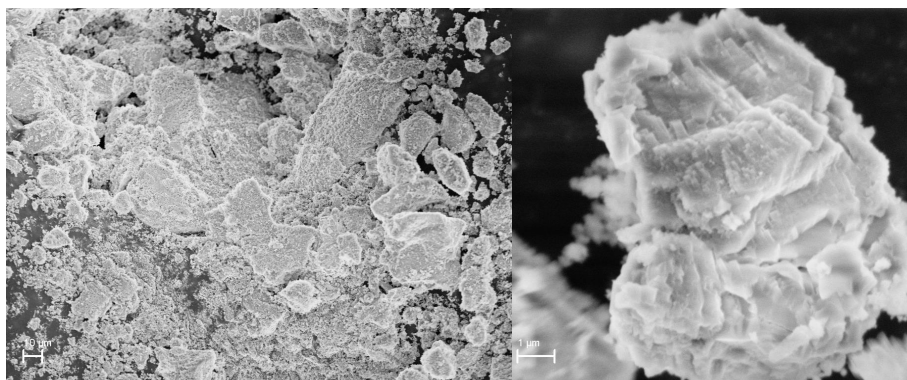


Figura 1. Micrografias obtidas por MEV da superfície das partículas do biovidro. Ampliação de 2.000x (direita) e ampliação de 20.000x (esquerda).

A identidade das células-tronco utilizadas no estudo foi confirmada a partir de morfologia fibroblastoide, aderência ao plástico, ensaio de diferenciação celular e perfil imunofenotípico. A Figura 2 apresenta o aspecto característico de CTMs com uma colônia ao centro.

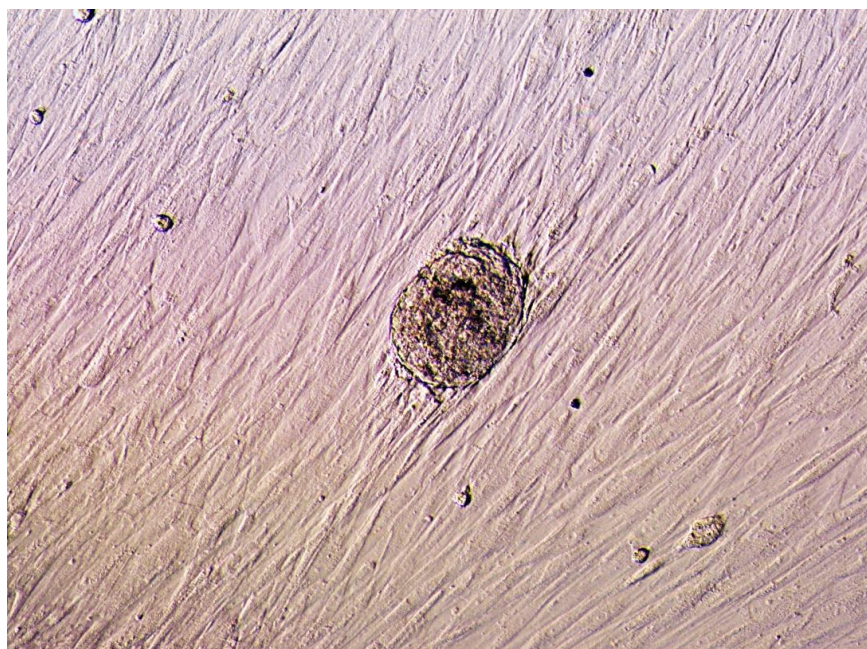


Figura 2. Morfologia das células-tronco mesenquimais. Ampliação de 20x.

As células foram capazes de produzir gotículas de gordura, coradas por óleo vermelho no interior das células, caracterizando a diferenciação adipogênica; glicosaminoglicanas, corados em azul por azul de alciano, acompanhados de mudança na morfologia celular, evidenciando a diferenciação condrogênica e matriz óssea, corada em vermelho por vermelho de alizarina no exterior das células, após a diferenciação osteogênica (dados não mostrados). A análise imunofenotípica da cultura primária das CTMs foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais anti-humanos contra os marcadores celulares característicos de CTMs. As células mostraram positividade para os marcadores CD29 (99,9%), CD44 (99,9%), CD73 (99,9%), CD90 (100%) e CD105 (99,7%). Os marcadores de células hematopoéticas, por sua vez, apresentaram baixa expressividade, conforme segue: CD14 (0,1%), CD34 (<0,1%), CD45 (<0,1%) e CD184 (0,9%).

Os resultados da análise de viabilidade celular pela técnica de MTT indicaram um aumento na viabilidade celular proporcional ao aumento da concentração de biovidro, em relação ao grupo controle. A Figura 3 ilustra o acréscimo acima de 20% na viabilidade celular das células cultivadas em contato com o biovidro, em concentrações iguais ou superiores a 0,5 mg/mL. Houve diferença estatística apenas entre os grupos controle, sem o biovidro (0 mg/mL), e aqueles com concentrações acima de 0,5 mg/mL do biovidro, o que indica que os benefícios da utilização dos biovidros funcionam de forma dose-dependente. Dessa forma, o presente estudo confirma a hipótese de biocompatibilidade do biomaterial testado com consequente possibilidade de sua utilização em diferentes áreas da engenharia de tecidos.

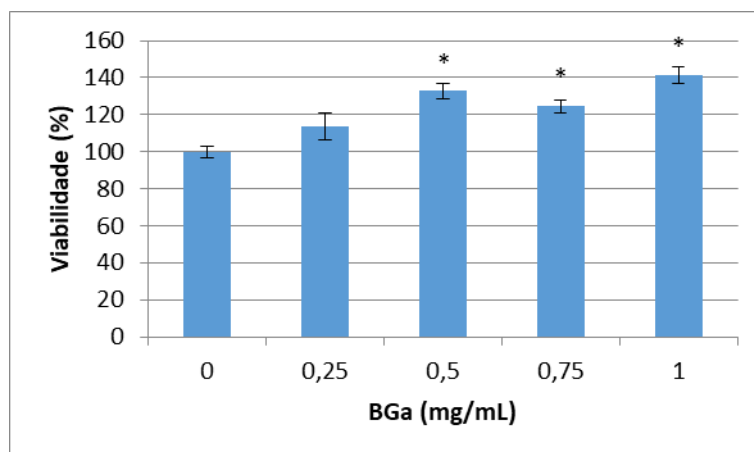


Figura 3. Viabilidade de células-tronco mesenquimais oriundas de dentes decíduos humanos tratadas com biovidro (BGA) e avaliadas por MTT (% do controle), após 24 horas de tratamento. $*p<0,01$.

4. CONCLUSÕES

O biovidro testado exibiu propriedades promissoras no que se refere à aplicação na engenharia tecidual envolvendo células-tronco mesenquimais, podendo constituir uma nova aplicação no contexto clínico na medicina regenerativa para a reconstrução óssea.

Apoio financeiro: MCTI, FINEP, CNPq, FAPESP, PROPESQ/UFRGS e Instituto de Pesquisa com Células-tronco (IPCT).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. **Annual Review of Chemical Biomolecular Engineering**, v. 2: p. 403-430, 2011.

CHALISSERRY, E. P.; NAM, S. Y.; PARK, S. H.; ANIL, S. Therapeutic potential of dental stem cells. **Journal of Tissue Engineering**, v. 23: p. 367-470, 2017.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8: p. 315- 317, 2006.

SIQUEIRA, R. L.; MAURMANN, N.; BURGUÊZ, D.; PEREIRA, D. P.; RASTELLI, A. N. S.; PEITL, O.; PRANKE, P.; ZANOTTO, E. D. Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: Bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against *Streptococcus mutans*. **Materials Science and Engineering C**. v. 76: p. 233-241, 2017.