

Caracterização do comportamento de células-tronco mesenquimais cultivadas em Matrigel™ para o emprego na engenharia de tecidos de cartilagem.

Raphaella Josino*¹, Marco Augusto Stimamiglio¹

¹Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas (ICC) – FIOCRUZ/PR

*Autora correspondente: rjosino@aluno.fiocruz.br



Introdução

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, capaz de tolerar uma grande quantidade de estresse mecânico intenso e repetitivo. Uma vez lesionadas, as articulações possuem potencial restrito de cura espontânea. Substratos biológicos derivados de matriz extracelular descelerizada (dMEC) representam um ambiente promissor para o cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) para a aplicação na medicina regenerativa da cartilagem articular. O hidrogel Matrigel™, produzido a partir de tecido cartilaginoso descelerizado, é um candidato interessante para promover a diferenciação homóloga das CTM, devido às pistas biomecânicas e moleculares que são encontradas no tecido nativo e preservadas durante o processamento e produção da dECM. O presente trabalho busca caracterizar o comportamento de CTMs cultivadas sobre Matrigel™ em termos de viabilidade, proliferação e diferenciação celular.

Procedimentos Experimentais



Resultados

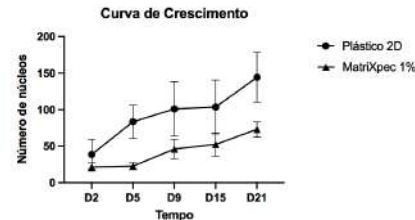


Figura 1. Curva de crescimento das CTMs cultivadas sobre plástico e Matrigel™ contabilizadas a partir de núcleos positivos para DAPI. Ao final de 21 dias de cultivo celular, as CTMs cultivadas sobre plástico apresentaram-se como uma população maior de células em comparação ao cultivo sobre o hidrogel.

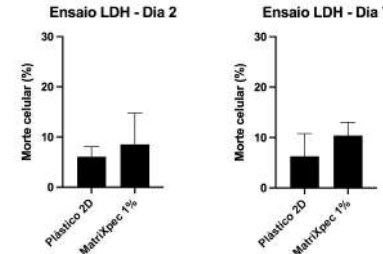


Figura 2. Ensaio de viabilidade celular LDH. Na condição 2D, o cultivo apresenta em média 5% de morte celular ao final de 2 dias e 8% ao final de 7 dias. Sobre Matrigel, 6% após 48h e 10% após 7 dias.

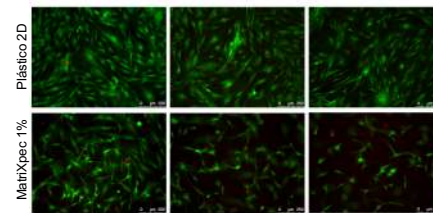


Figura 3. Ensaio LIVE/DEAD após 7 dias de cultivo celular. Células vivas são marcadas em verde enquanto núcleos de células mortas são evidenciados na cor vermelha.

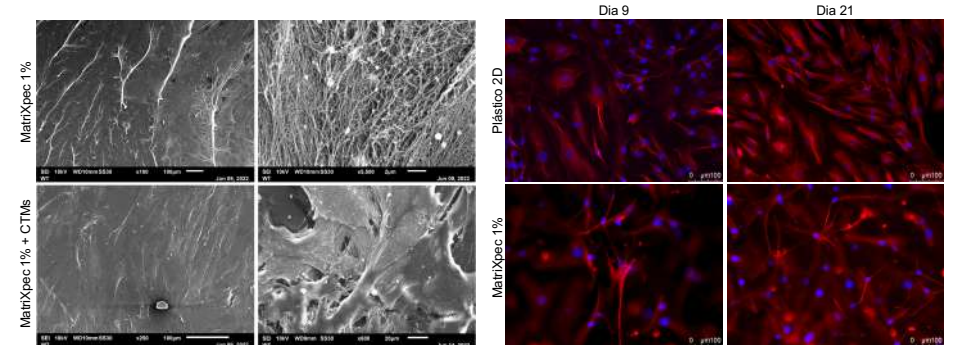


Figura 4. Caracterização da ultraestrutura do hidrogel Matrigel através de microscopia eletrônica de varredura. O biomaterial apresenta uma estrutura altamente reticulada e fibrosa.

Figura 5. Aspecto morfológico das CTMs cultivadas sobre Matrigel nos dias 9 e 21 do cultivo celular. Quando cultivadas em um ambiente tridimensional – representado por Matrigel – as CTMs adotam uma morfologia fusiforme, característica importante para que os diferentes planos do hidrogel sejam povoados.

Conclusões Preliminares

- O cultivo de células-tronco mesenquimais sobre o hidrogel Matrigel™ é viável, uma vez que as células não apresentam um percentual importante de morte celular quando submetidas a tal condição;
- A ultraestrutura do hidrogel Matrigel™ apresenta-se fibrosa e reticulada, oferecendo uma miríade de informações tridimensionais às células;
- A dinâmica de crescimento das células-tronco mesenquimais cultivadas em Matrigel™ é diferente do observado quando seu cultivo é realizado sobre plástico. As células tendem a crescer de forma mais lenta;
- No cultivo sobre Matrigel™, observa-se a tendência da diminuição dos pontos de contato da célula com o hidrogel, revelando uma morfologia fusiforme e projeções em diversos planos do hidrogel tridimensional. Hipotetiza-se que o aspecto fusiforme adotado pelas células seja importante em termos de migração e povoação de diferentes planos do hidrogel.

Referências

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.
 CARBALLO, C. B.; NAKAGAWA, Y.; SEKIYA, I.; RODEO, S. A. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine*, v. 36, n. 3, p. 413-425, 2017.
 CATOIRA M.C.; FUSARO L.; DI FRANCESCO D.; RAMELLA M.; BOCCAFOSCHI F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med*, v. 30, n. 10, p. 115, 2019.



Caracterização do comportamento de Células-Tronco Mesenquimais cultivadas em MatriXpec™ para o emprego na engenharia de tecidos de cartilagem.

Raphaella Josino^{1*}; Marco Augusto Stimamiglio¹

¹Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, Departamento de Ciências Básicas de Células-Tronco, Curitiba, Paraná, Brasil.

*raphaellajosino3006@gmail.com; Tel.: (47) 9 9675-1037.

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, capaz de tolerar uma grande quantidade de estresse físico intenso e repetitivo, no entanto, sua capacidade de cura espontânea é restrita. Tanto as características funcionais notáveis quanto as limitações de cura refletem a complexidade de sua estrutura e biologia, como a baixa atividade mitótica dos condrócitos e ausência de vascularização. Uma vez lesionado, as injúrias no tecido cartilaginoso tendem a se acumular e podem levar a quadros graves de doenças articulares como a osteoartrite, considerada a doença articular mais comum no mundo, afetando cerca de 600 milhões de pessoas. Diante desse cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias para promover o reparo de tecidos cartilagosos lesionados. O uso de biomateriais e a construção de arcabouços tridimensionais (3D) vem ao encontro dessa demanda clínica, possibilitando que células-tronco mesenquimais (CTM) sejam incorporadas aos processos de biofabricação de tecidos para o uso na medicina regenerativa. O objetivo do presente trabalho é caracterizar a dinâmica de comportamento das CTM cultivadas tridimensionalmente sobre o hidrogel MatriXpec™, um biomaterial comercial obtido a partir de tecido cartilaginoso descelularizado. O hidrogel MatriXpec™ foi avaliado quanto à sua ultraestrutura pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e capacidade de permitir a adesão e cultivo de CTM humanas derivadas do tecido adiposo. Estas avaliações foram feitas por marcações imunofluorescentes e ensaios de viabilidade celular por meio da quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultivo, respectivamente. Após polimerização, o hidrogel apresentou estrutura tridimensional fibrosa, justificada por sua composição colágena, a qual representa ambiente mecânica e biologicamente similar ao encontrado pelas células no tecido cartilaginoso nativo. Foi possível verificar que as CTM aderem ao hidrogel e ocupam todos os planos do mesmo. Por fim, verificou-se que o hidrogel não possui efeito citotóxico e permite a manutenção dos cultivos celulares. O hidrogel MatriXpec™ demonstra ser um candidato promissor para o cultivo de células-tronco para aplicações no reparo de lesões cartilaginosas devido às suas possíveis propriedades condro-instrutoras. Como perspectiva, têm-se a avaliação da diferenciação cartilaginosa a partir de CTM cultivadas em MatriXpec™.

Palavra-chave: Arcabouço 3D; Condrogênese; Hidrogel; Medicina Regenerativa; Terapia Celular.