

DESENVOLVIMENTO DE TECIDO ENDOTELIAL IN VITRO A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS

Larissa Miwa Kikuchi Ochikubo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientador), e-mail: tiesvidzinski@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Maringá, PR.

Área: 40000001 Ciências da saúde

Subárea: 40300005 - Farmácia

Palavras-chave: Linhagens celulares, Modelo de estudo *in vitro*, Tecido reconstituído

Resumo:

Os métodos alternativos que substituem o uso de animais em experimentos ainda são insuficientes, logo, pesquisas com tecidos reconstituídos *in vitro* podem ser uma interessante solução. Assim, o objetivo deste projeto foi desenvolver um tecido *in vitro*, utilizando arcabouço biopolimérico nanoestruturado e células de fibroblastos, com a finalidade servir como modelo de estudo para ensaios pré-clínicos de produtos com ação antifúngica e avaliação da interação hospedeiro-patógeno. O arcabouço biopolimérico nanoestruturado foi sintetizado por eletrospinação, avaliado macro e microscopicamente. Analisou-se ainda a citotoxicidade e a interação com células. O arcabouço biopolimérico nanoestruturado de PCL foi atóxico para as linhagens celulares L929, HeLa e Vero. Houve a colonização e proliferação dos fibroblastos sobre o arcabouço, com crescimento linear, mimetizando a matriz extracelular e um tecido animal *in vitro*. Neste estudo foi possível formalizar um tecido reconstituído *in vitro* para estudos de modelo de infecção e farmacológico.

Introdução

A busca de alternativas para substituir o uso de animais em experimentos está se fortalecendo, devido à preocupação a respeito com o comitê de ética e o bem estar animal. Apesar do desenvolvimento tecnológico, ainda não há métodos alternativos para abolir por completo o uso de animais, logo, os tecidos *reconstituídos in vitro* podem ser uma solução. Os modelos 3D de tecidos desenvolvidos *in vitro* apresentam vantagens como a capacidade de fornecer um microambiente celular que imitam o microambiente observado nos tecidos nativo, mimetizando situações *in vivo*, em termos de controle de gradiente de moléculas

sinalizadoras e agentes terapêuticos, composição e estrutura da matriz extracelular (MEC) ao redor das células, bem como morfologia e arranjo de células individuais (ELLIOT, 2011).

Para o desenvolvimento do tecido reconstituído é preciso de um arcabouço (*scaffold*) que seja biocompatível, biodegradável e biorreabsorvível, auxiliando com suporte físico e mecânico, fácil de manusear, moldar e formar nanofios e que permita a interação com o *scaffold* e a *célula*, pois as células isoladas, sozinhas não são capazes de formalizar um tecido. Os biopolímeros, seja eles de origem animal ou vegetal como a quitosana (QUI) ou sintéticos como a policaprolactona (PCL) apresentam ampla aplicabilidade e potencial para serem um arcabouço, sendo biocompatíveis, sofrem hidrólise no organismo, viabilizando o processo de reconstrução tecidual apresentam facilidade de processamento e modulação da taxa de degradação, propriedades mecânicas e viscoelásticas (RAYMUNDO, 2017). A busca por um *scaffold* ideal e colonizá-la com linhagens celulares para a formalização de um tecido *in vitro*, pode auxiliar na substituição de uso de animais como modelo experimental.

Materiais e métodos

Eletrofiação do arcabouço biopolimérico nanoestruturado (*scaffold*): os biopolímeros quitosana (QUI) e policaprolactona (PCL, Aldrich chemistry®, UK) foram cedidos pelo laboratório de química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e sintetizado pelo método de *eletrospinning* adaptado. Após a formação dos *scaffolds* (QUI e PCL) estes foram cortados com diâmetro de 0,5 cm² e hidratado durante 24 horas antes de colocar em contato com as células.

Linhagens celulares e manutenção: as linhagens de células utilizada foram HeLa (ATCC® CCL-2™) e Vero (ATCC® CCL-81™) e L929 (ATCC® CCL-1™) mantidas em garrafas de cultivo celular com meio completo à 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco®, Grand Island, NY, EUA), e incubadas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂.

Avaliação da Citotoxicidade: foi realizada de acordo com VEIGA. (2018) com o polímero previamente esterilizados hidratado.

Aplicação dos polímero na linhagem celular: *scaffold* que apresentou menor citotoxicidade foi avaliado. Após a esterilização e hidratação do *scaffold*, estes foram colocadas em placas de 96 poços e em seguida a linhagem celular foi semeada sobre o biopolímero nanoestruturado.

Avaliação da interação entre *scaffold* e as linhagens celulares: foi avaliado por três parâmetros: microscopia por contraste de fase (MCF), acompanhando o crescimento celular sobre o biomaterial; e a microscopia de varredura (MEV).

Avaliação do crescimento celular sobre o *scaffold*: foi cultivada a linhagem celular L929 sobre em diversas concentrações: 1x10⁵, 2,5x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶, 2,5x10⁶, 5x10⁶, 7,5x10⁶, 1x10⁷, 2,5x10⁷, 5x10⁷, 7,5x10⁷, 1x10⁸, 2,5x10⁸, 5x10⁸ e incubada a 37 °C / 5% CO₂ por 24 hora e avaliada a

viabilidade celular pelo método de MTT. Os valores obtidos em absorbância foram convertidos em cel/cm² por meio da equação da reta.

Resultados e Discussão

Neste estudo analisou-se as características dos arcabouços PCL e PCL+QUI desenvolvidos pela técnica de *eletrospinning* adaptado. Macroscopicamente ambos apresentaram opacidade e cor branca, elasticidade e pouca mobilidade, semelhante com a MEC natural dos tecidos humanos. Microscopicamente houve formação de nanofibras, sendo que o de PCL+ QUI eram mais finos e com estruturas poliméricas de impurezas. Em contrapartida, o PCL possuiu nanofios espessos sem impurezas, aumentando a porosidade e aderência celular, escolhendo assim, o PCL como o arcabouço ideal.

Ao avaliar a citotoxicidade do *scaffold* com as linhagens celulares Hela, Vero e L929, de acordo com a norma ISO 10993-5, demonstrou baixa citotoxicidade e com melhor desempenho de crescimento para os fibroblastos. Ao acompanhar a evolução linhagem L929 sobre o PCL, houve adesão celular sobre no material e possível formação da matriz extracelular (Fig. 2).

Em seguida, avaliou-se a interação entre os fibroblastos sobre o biopolímero e a taxa de crescimento das células sobre o scaffold, formando a curva de crescimento. Percebeu-se o crescimento linear com a concentração celular por cm² do nanofio de PCL e a concentração de L929 cultivado sobre o material. Selecionou-se as concentrações celulares 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 1×10^6 , 5×10^6 , $7,5 \times 10^6$, e obteve-se o valor do R² igual a 0,9914 e a equação da reta sendo $y = 5.682.051,55x - 710.824,78$.

A colonização celular dos fibroblastos no nanofio foi efetivo devido a biocompatibilidade, grande área de superfície e estrutura porosa do produto. Estas características são essenciais para o desenvolvimento da estrutura 3D de um tecido, favorecendo a adesão, proliferação e diferenciação celular (SURYAMATHI, 2019). Os resultados permitiram observar que o microambiente desenvolvido pelo arcabouço auxiliou no desenvolvimento do tecido, pois segundo ELLIOTT (2011), sinais ambientais podem causar mudanças na forma e na mobilidade das células, influenciar a proliferação, diferenciação, apoptose e afetar a morfogênese das estruturas celulares.

Determinando a equação da reta com a curva de crescimento a próxima etapa seria a avaliação da infecção fúngica nesse tecido reconstituído e seu tratamento com um produto natural de ação antifúngica, mas devido a pandemia causada pelo COVID-19, não foi possível dar a continuidade ao estudo.

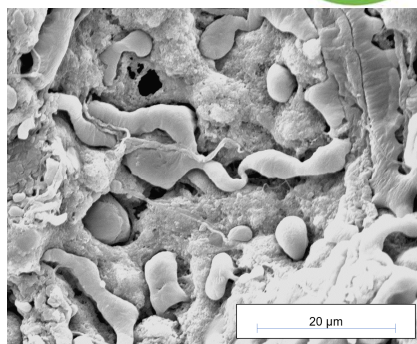


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do *ScaffoldI* polimérico de PCL com colonização dos fibroblastos da linhagem celular L929.

Conclusões

Foi efetivo formalizar um tecido reconstituído in vitro para estudos modelo de infecção e farmacológico.

Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de micologia médica, CNPQ/ FA, CONCAP-UEM e a minha orientadora e coordenadora Terezinha Svidzinski e Melyssa Negri

Referências

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A. N. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 1, p. 59-74, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

RAYMUNDO, A. J. V. *et al.* OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS POR ELECTROSPINNING PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS. **Volkmer Disciplinarum Scientia**. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 329-339, 2017.

SURYAMAYHI, M. *et al.* *Tridax Procumbens* Extract Loaded Electrospun PCL Nanofibers: A Novel Wound Dressing Material. **Macromolecular Research**, v. 27, p. 55–60, nov, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13233-019-7022-7>. Acesso em: 24 de junho de 2020.

VEIGA FF., *et al.* Propolis Extract for Onychomycosis Topical Treatment: From Bench to Clinic. **Front Microbiol**. 2018; 25;9:779.