

Interação de Células MC3T3 com Membranas de PLA Densas e Eletrofiadas

CR Michelato*, FN Ambrosio*, AP Romani*, EC Venâncio**, RA Lombello***, CB Lombello *

*Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo/SP, Brasil

** Engenharia de Materiais, Universidade Federal do ABC, Sato André/SP, Brasil

***Ciências Biológicas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo/SP, Brasil

e-mail: christiane.lombello@ufabc.edu.br

Abstract – *Tissue engineering is a multidisciplinary area of knowledge that focus on the maintenance, repair or improve of tissue function. The interaction between living tissues and biomaterials is influenced by the biomaterial characteristics, such as contact surface, hydrophilicity, and electric charges. These surface properties direct cellular behavior such as adhesion, migration, proliferation, growth and cellular differentiation. The poly (lactic acid), PLA, is a synthetic polymer used in different clinical application, including tissue engineering. In this study we evaluated the interaction of MC3T3 pre-osteoblastic cells with PLA biomaterials, obtained by casting or electrospinning. There were used light microscopy, with phase contrast, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy. The tested biomaterials were considered non cytotoxic. The cells cultivated onto PLA casting showed morphological characteristics similar to the cell lineage pattern, spread and with intense interaction with the scaffold. The electrospun biomaterials induced different cell behavior, with contact cell adhesion on the fibers. PLA structure influenced the MC3T3 cell adhesion and spreading onto the scaffolds obtained by casting and electrospinning.*

Palavras-chave: *Biomaterial, Microscopia, Osteoblastos, Técnicas de cultura celular.*

Introdução

A engenharia de tecidos é uma ciência multidisciplinar que reúne conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde e de engenharia e ciência dos materiais com o objetivo de manutenção, reparo ou melhora da função tecidual [1]. A engenharia de tecidos possui três elementos fundamentais: biomateriais, células e um microambiente específico [2,3].

Neste contexto os biomateriais são conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços) utilizados como substrato para o cultivo de células de forma a desenvolver um novo tecido ou mesmo restaurar a função tecidual [4]. O desenvolvimento dos biomateriais com esta

finalidade é baseado em duas características importantes para a interação biológica: biocompatibilidade e biofuncionalidade. Ou seja, o biomaterial visa uma resposta adequada do organismo, buscando a similaridade com mecanismos de regeneração naturalmente presente, possibilitando a recuperação de funções perdidas [5].

Dentre os diferentes biomateriais os polímeros apresentam características que favorecem sua aplicação em engenharia de tecidos. Podemos classificar os polímeros quanto a sua origem como naturais, como o colágeno, ou sintéticos, como poli (α -hidróxi ácidos), com potencialidade para substitutos capazes de guiar processos biológicos [6,7]. O poli (ácido láctico) (PLA) é um polímero sintético, dentre os poli (α -hidróxi ácidos), biocompatível, biodegradável e bioreabsorvível, com diferentes aplicações clínicas relatadas, incluindo cartilagem, pele, válvulas cardíacas e tecidos musculoesqueléticos [5-9].

A interação dos biomateriais com o tecido vivo, e com as células que compõe este tecido, é intermediada por algumas das características dos biomateriais, como superfície de contato, rugosidade, hidrofiliabilidade, porosidade e cargas elétricas. Estas características direcionam comportamentos celulares, tais como migração, adesão, proliferação, crescimento e diferenciação [10-14].

A porosidade é uma das características dos biomateriais mais estudadas quanto a sua interferência no processo de interação com as células, por meio da adsorção de proteínas adesivas, adesões focais e espalhamento celular. Além da interação celular a porosidade também afeta outro processo considerado durante a regeneração tecidual, a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos. Em geral macroporos interconectados favorecem tanto a celularização de um biomaterial quanto sua vascularização [14, 15].

Neste projeto foram desenvolvidas culturas de células pré-osteoblástica, da linhagem MC3T3, em biomateriais de PLA densos, obtidos por *casting*, e

porosos, obtidos por eletrofição. A interação das células com os biomateriais e a influencia da porosidade destes no comportamento celular foi avaliada por diferentes técnicas de microscopia.

Materiais e Métodos

Cultura de Células da linhagem MC3T3

As células M3CT3-E1 foram mantidas com meio alfa-MEM, 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina, a 37 °C e 5 % CO₂.

Preparo de membranas de PLA

Foram preparadas membranas densas e porosas de PLA segundo protocolo descrito anteriormente [16]. As amostras foram cedidas pelo Grupo de Pesquisa da UFABC composto pelo Prof. Dr. Everaldo Carlos Venancio, Profa. Dra. Ana Paula Romani e a aluna Marjorie Santos de Carvalho.

A solução de PLA foi preparada dissolvendo-se 0,250 g do polímero em 5 mL de uma mistura de solventes (clorofórmio, 4 mL, e álcool etílico, 1 mL), sob agitação magnética. Para o preparo das membranas 2 mL da solução PLA foram inseridos em um molde para secagem a temperatura ambiente. As membranas de PLA também foram preparadas utilizando-se a técnica de eletrofição. Para tanto foi utilizada uma seringa de vidro, com 1 mm de diâmetro interno, contendo 2 mL da solução de PLA. A seringa foi posicionada a 10 cm do coletor. A eletrofição foi realizada sob uma vazão de 1 mL/h a uma tensão (DC) de 15 kV. Utilizou-se o sistema construído no Laboratório de Engenharia de Macromoléculas da UFABC – Campus Santo André.

Inóculo celular e preparo da amostra

As células da linhagem MC3T3, foram inoculadas sobre amostras de PLA, por deposição direta de suspensão contendo 2×10^5 células / mL, em placas de cultura de 12 poços, utilizando como controle a placa de cultura e lamínulas de vidro. As análises morfológicas foram feitas após 24 horas de cultura. Os testes foram realizados em duplicata.

Microscopia de Contraste de Fase

As culturas foram observadas por contraste de fase, em microscópio invertido (Axiovert A1, Zeiss) para verificação de morfologia celular.

Microscopia de Fluorescência

Os biomateriais, com células cultivadas, foram fixados com glutaraldeído 2,5%, lavados em água e desidratados. Após a coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), as observações foram

realizadas ao microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon), com a colaboração do Prof. Ricardo Augusto Lombello.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As culturas celulares sobre biomateriais foram fixadas com glutaraldeído 2,5%, lavadas, submetidas a desidratação em ponto crítico (EM CPD300, Leica), recobertas com ouro (AC200, Leica), e observadas ao MEV (Quanta 250, FEI).

Resultados

Pode ser observada, com microscopia de luz e de contraste de fase, a formação de monocamada celular na presença dos biomateriais, ao redor das amostras depositadas em placa de cultura, com a manutenção da morfologia característica das células MC3T3, comparada ao controle, cultura celular na placa e na presença de lamínula de vidro (Figura 1). As amostras de PLA podem ser consideradas não citotóxicas segundo estes dados.

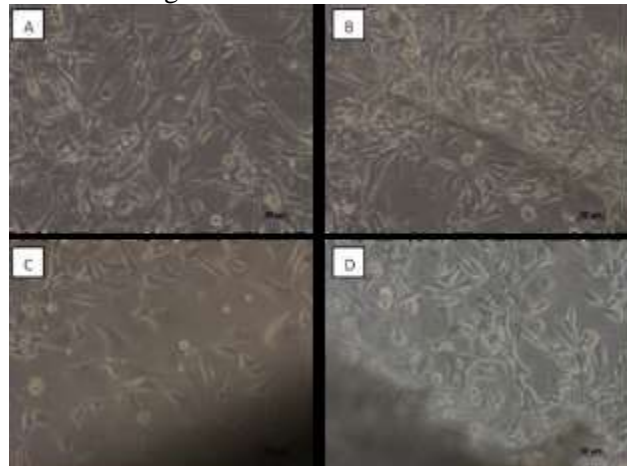


Figura 1: Células cultivadas em: A. Placa de cultura. B. Lamínulas. C. PLA *casting*. D. PLA eletrofição.

A microscopia de fluorescência possibilitou a observação das células sobre os diferentes substratos, lamínula (controle), PLA por *casting* e PLA eletrofiado. As células cultivadas sobre lamínulas de vidro apresentaram-se alongadas, com núcleo ovoide acompanhado o eixo principal da célula, também alongado, característica da linhagem (Figura 2A). As células na superfície dos biomateriais apresentaram uma morfologia irregular, alongadas, e com prolongamentos citoplasmáticos (Figuras 2B, 2C, 2D).

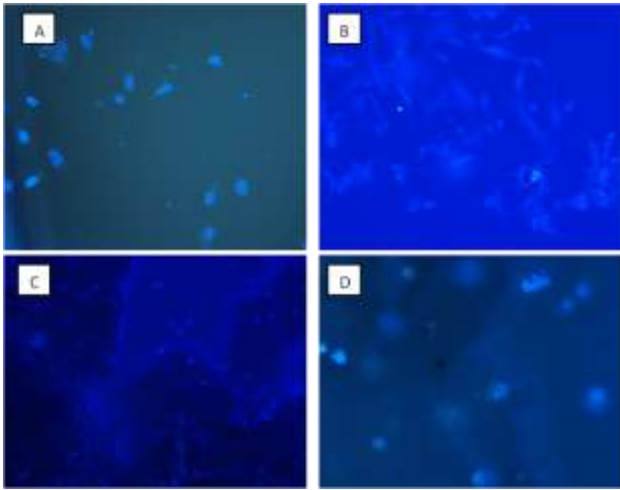


Figura 2: Microscopia de fluorescência. A. Lamínula B. PLA *casting*; C,D. PLA eletrofiado. Aumentos: A,B,C: 100x; D: 200x.

As células cultivadas em membranas PLA densas (*casting*) mostraram uma morfologia semelhante à cultivada em lamínulas de vidro, controle (Figura 2A), no entanto a opacidade destas amostras dificultou a observação (Figura 2B). As células aderidas as amostras de PLA poroso, eletrofiado, apresentaram uma morfologia irregular, menos alongada (Figuras 2C, 2D).

As observações ao MEV permitiram a observação da interação celular com ambos os biomateriais complementando as análises a microscopia de luz. As células cultivadas nas amostras de PLA *casting* apresentaram regiões de camada monocelular semi-confluyente em áreas específicas das amostras, mas sem organização em múltiplas camadas celulares (Figuras 3C, 3D). Esse comportamento é semelhante ao padrão de crescimento normal observado para estas células em estado não diferenciado, pré-osteoblásticas, sendo observado também em superfícies controle, como o vidro das lamínulas (Figuras 3A, 3B). No entanto este padrão difere dos padrões de crescimento observados em substratos biológicos naturais. A interação entre células e matriz extracelular é intermediada por contatos focais e bioestimulação celular intermediada por elementos da matriz extracelular, em padrão semelhante ao observado em PLA eletrofiado (Figuras 3E, 3F).

Discussão

As MC3T3 são uma linhagem de células osteoblásticas estabelecidas a partir da calota craniana de camundongos C57BL/6, e selecionadas com base na elevada atividade da fosfatase alcalina no estado de repouso. Estas células têm a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos e depositarem hidroxiapatita. O processo de diferenciação em culturas de células MC3T3 é muito semelhante ao

observado na osteogênese intermembrana *in vivo* [17, 18]. Por estes motivos são utilizadas para avaliação de biomateriais com a proposição de interação com tecidos músculo-esqueléticos, especialmente com o tecido ósseo.

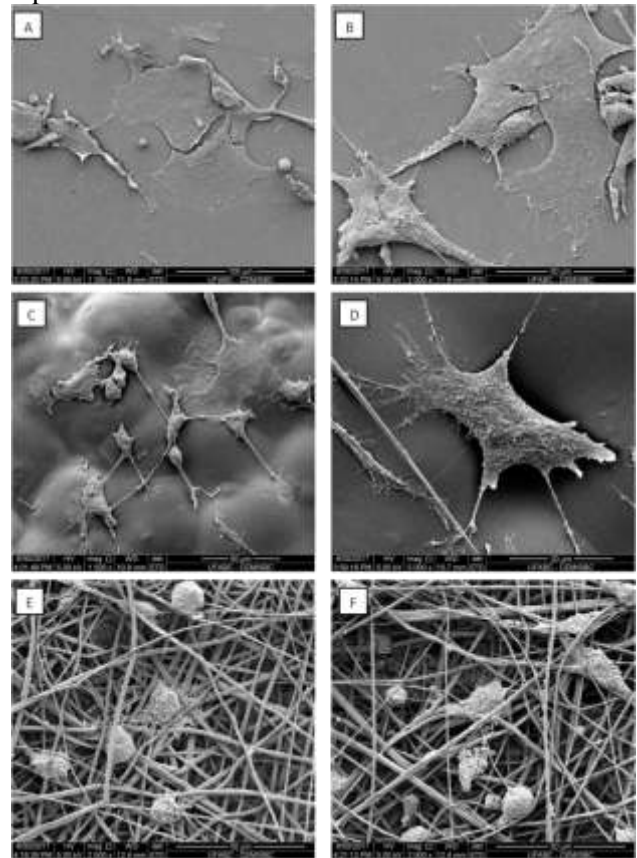


Figura 3: MEV, cultura celular de MC3T3, 24h. A,B. Células cultivadas em lamínula. C, D. PLA *casting*. E, F. PLA eletrofiado.

As amostras de PLA incluídas neste estudo podem ser consideradas não citotóxicas, tanto as amostras obtidas por *casting* quanto por eletrofição, em concordância com relatos da literatura [6]. As culturas de células MC3T3 apresentaram padrão de proliferação celular nas condições experimentais, semelhante ao padrão de crescimento da linhagem [17, 18]. O aumento da população celular nas condições experimentais pode ser evidenciado pelas análises por contraste de fase, e sugerem a biocompatibilidade dos biomateriais [14]. No entanto a microscopia por contraste de fase não favorece a observação direta das células sobre as amostras de biomateriais, sendo utilizada preferencialmente para avaliar a camada de células na placa de cultura ao redor das amostras de biomateriais.

A observação de células MC3T3 sobre as lamínulas de vidro e sobre os biomateriais pode ser avaliada por outras técnicas de microscopia, fluorescência e MEV. Estas técnicas são fundamentais para a complementação da avaliação

de interação entre células e substratos [19, 20]. As células cultivadas nas amostras de PLA *casting* apresentam morfologia semelhante ao padrão de crescimento observado para estas células em estado não diferenciado, pré-osteoblásticas, sendo observado também em superfícies controle, como o as placas de cultura [14, 17, 18]. As células cultivadas em PLA eletrofiado interagem com os biomateriais ao longo das fibras, sendo o corpo celular projetado no espaço entre estas. As alterações na morfologia celular em virtude do substrato estão relacionadas à reorganização de rede de citoesqueleto em resposta as características de superfície dos biomateriais, como a topografia dos polímeros, a rigidez / flexibilidade e composição química, direcionando eventos de adesão, migração celular e diferenciação celular [20].

Conclusões

Foram desenvolvidas culturas de células pré-osteoblásticas, da linhagem MC3T3, em biomateriais de PLA densos, obtidos por *casting*, e porosos, obtidos por eletrofição. A interação das células com os biomateriais e a influencia da porosidade destes no comportamento celular foi avaliada por diferentes técnicas de microscopia. Os biomateriais não apresentaram sinais de citotoxicidade. Foi possível concluir que as células cultivadas em PLA *casting* apresentaram padrão de adesão, com bom espalhamento celular, e as células cultivadas em PLA eletrofiado exibiram uma forma alongada e aderiram às fibras do biomaterial, com contatos focais de adesão, em padrão distinto daquele observado para o *casting*. A estrutura dos biomateriais induziu ao comportamento diferenciado de adesão e interação das células da linhagem, avaliado por microscopia eletrônica de varredura.

Agradecimentos

Agradecemos a Central Experimental Multiusuário (CEM) da UFABC pelo apoio técnico, para o preparo de amostras e observação ao MEV.

Referências

[1] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295(5557):1009.
[2] William S DF. Definition in Biomaterials, Consensus Conference ESB, 1987.
[3] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-926.
[4] Hillmann G, et al. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002 ,23:1461-1469.
[5] Ratner BD et al. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press, 1996.

[6] Barbanti SH. et al. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2005;.15:13-21.

[7] Jahno VD et al. Síntese e caracterização do poli (ácido l-láctico) e sua avaliação em culturas de osteoblastos humanos. *Congresso Brasileiro de Engenharia Ciência dos Materiais* 2006:7837-7847.

[8] Danisovic L et al. The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors. *Exp Bio Med* 2012;237:10-17.

[9] Boottcher-Haberzeth S et al. Tissue engineering of skin. *Burns* 2010;36:450-460.

[10] Lyndon MJ et al. Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials* 1985;6:396-402.

[11] Dewez JL et al Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. *Biomaterials* 1998;19:1441-1445.

[12] Thevenot P et al. Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds. *Tissue Eng. Part C, Methods* 2008;14(4):319-331.

[13] Santos JR AR et al. Analysis of the growth pattern of Vero cells cultured on dense and porous poly (L-Lactic Acid) scaffolds. *Materials Research* 2009;12(3):257-263.

[14] Wang X et al. The effect of fiber size and pore size on cell proliferation and infiltration in PLA scaffolds on bone tissue engineering. *J Biomater Appl* 2016;30(10):1545-1551.

[15] Zeltinger J et al.. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng* 2004;7(5):557-572.

[16] Carvalho MS. Estudo do efeito da concentração de PPY e conformação por eletrofição de blendas de PPY/PLA. Monografia, Universidade Federal do ABC, curso de graduação em Engenharia de Materiais. UFABC, 2017.

[17] Sudo H et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983;96(1):191-198.

[18] Wang D. et al. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Mineral Res* 199;14:893-903.

[19].Lombello CB et al. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly (HEMA-co-AA) substrates. *Cytobios* 2000;101(397):115-122.

[20].Nascimento MHM. et al. Evaluation of cell interaction with polymeric biomaterials based on hyaluronic acid and chitosan. *J Mater Sci Mater Med* 2016;28(5):68.