

Produção de construtos celulares tridimensionais bioimpressos de fibroblastos murinos (NIH/3T3)

Candidato(a): Giovana Dias da Silva
Orientador(a): Janaina de Andréa Dernowsek

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)

INTRODUÇÃO

A bioimpressão é uma tecnologia com condições para criar aglomerados celulares que assemelham-se aos tecidos vivos através do *design* de biomateriais e avanços na polimerização, proporcionando transporte de solutos e nutrientes pelas interconectividade dos poros, contribuindo para o crescimento celular e viabilidade celular. O trabalho utilizou hidrogéis de alginato de sódio, Pluronic F-127 e celulose microcristalina. Esses têm propriedade de capturar diversas moléculas, permitindo a difusão dentro da estrutura tridimensional, assim, auxilia na troca de nutrientes para a célula devido aos canais microfluídicos [1]. As células utilizadas para formação de estruturas tridimensionais juntamente com o hidrogel são de linhagem fibroblástica murina (NIH/3T3). Essas são provenientes do tecido conjuntivo de origem de células mesenquimais indiferenciadas.

OBJETIVO

Desenvolver uma estrutura contendo células de fibroblastos murinos (NIH/3T3) e matrizes poliméricas biocompatíveis.

METODOLOGIA

As células de fibroblastos (NIH/3T3) foram cultivadas em garrafas de cultura celular de

25 cm² contendo meio RPMI 1640 e foram mantidas em uma incubadora. O Pluronic F-127 foi dissolvido em meio RPMI 1640 em agitador magnético em banho de gelo. As soluções foram misturadas na proporção 5:1. O alginato de sódio foi adicionado em salina-fosfato tamponada em um homogeneizador. Celulose microcristalina foi suspensa em água deionizada e ácido sulfúrico (0,1M). Os hidrogéis foram homogeneizados em 4 microtubos, pipetados nas placas de Petri e foi adicionado cloreto de cálcio, e após lavagem as peças foram submersas em meio de cultura. As estruturas tridimensionais contendo 5:1 (alginato/Pluronic® F-127), celulose células foram misturadas. Para avaliar a viabilidade celular, removeu-se o meio de cultura da estrutura e adicionou meio de cultura contendo Hoescht e brometo de etídio (50µg/mL). O mesmo processo nas estruturas contendo alginato, celulose microcristalina e 2 x 10⁵ de células de fibroblastos, sendo coradas com laranja de acridina e brometo de etídio (50µg/mL).

RESULTADOS

Nas amostras de NIH/3T3 na combinação de hidrogéis após 48 horas foi constatado viabilidade celular. Os cultivos de 2x10⁵ células, há uma quantidade apreciável de núcleos marcados positivamente para Hoescht e desprezível para EtBr, o que leva a entender que, em 48 horas, a maioria das células mantém-se viável, como relatado na Figura 1 e também na Figura 2 corada com laranja de acridina e brometo de etídio.

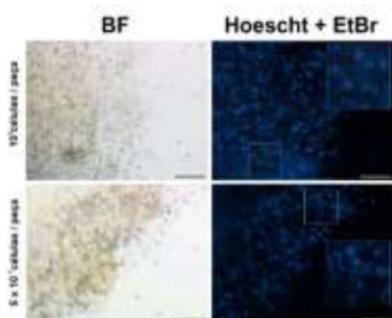


Figura 1. Cultivos de 2×10^5 células NIH/3T3 em alginato (3,7%) e Pluronic F127 (26%) após 48 horas. Barras: 200µm.

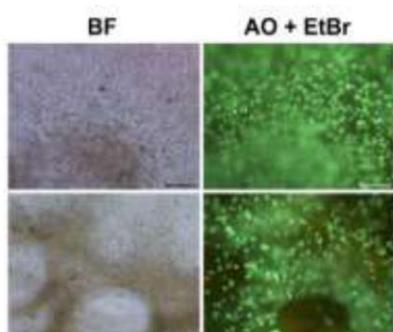


Figura 2. Cultivos de 2×10^5 células NIH/3T3 em alginato (3,7%) e Pluronic F127 (26%) após 48 horas em cultura. Barras: 200µm.

O experimento de estabilidade do construto utilizou diferentes proporções e misturas de hidrogéis, demonstrando a degradação de determinados biomateriais após 48 horas, constatando que as amostras que continham celulose microcristalina detinham menos degradação, apresentaram mais integridade, como analisado na Figura 4, em comparação a estrutura da Figura 3 que continha apenas alginato e Pluronic F-127.

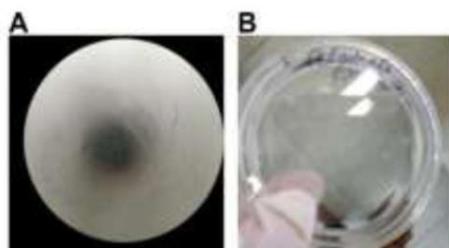


Figura 3. Ensaio de estabilidade contendo Alginato 3,7% e Pluronic F127 após 48 horas.

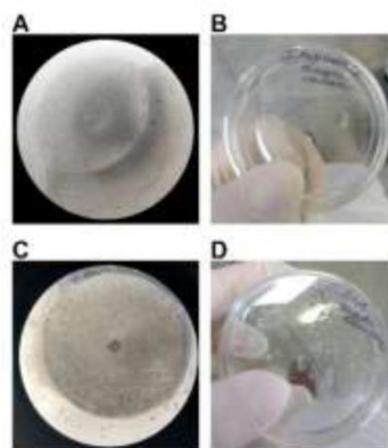


Figura 4. Ensaio de estabilidade. (A) e (B): Alginato 3,7%, Pluronic F-127 e Celulose microcristalina 2,5%. (C) e (D): 500µL de Alginato 3,7%, 50µL de Pluronic F127 e 200µL de Celulose microcristalina 2,5%.

CONCLUSÕES

Construtos produzidos com alginato de sódio e celulose microcristalina se mostraram mais resistentes e íntegros do que os com Pluronic F-127, indicando o uso da celulose em cultivos 3D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Gopinathan, J.; Noh, I. Recent trends in bioinks for 3D printing.pdf. Biomaterials Research, p. 1–15, 2018. <https://biomaterialsres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40824-018-0122-1>.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

PIBITI/CNPq (129687/2021-9) e IPEN/CNEN.