

Avaliação de diferentes filmes na adesão de células-tronco epiteliais da membrana amniótica humana

Débora de Souza dos Santos Costa, Joana Mona e Pinto; Lucas Sant'ana Silva; Eduardo Siqueira; Luiz Fernando Fonte Boa; Roberta da Costa Escaleira.

Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) – HNMD

Contato: debora.costa@marinha.mil.br

Resumo Estruturado

Introdução

As células-tronco epiteliais (hAECs) da membrana amniótica humana (MAH) têm alta plasticidade fenotípica e baixa imunogenicidade, sendo promissoras para a medicina regenerativa^{1,2} (figura 1). Diversos protocolos de isolamento destacam a dificuldade em aumentar o rendimento sem comprometer a viabilidade celular. Como a adesão da célula ao frasco de cultura é essencial para sua sobrevivência³, este estudo testou quatro diferentes filmes para melhorar esse processo.

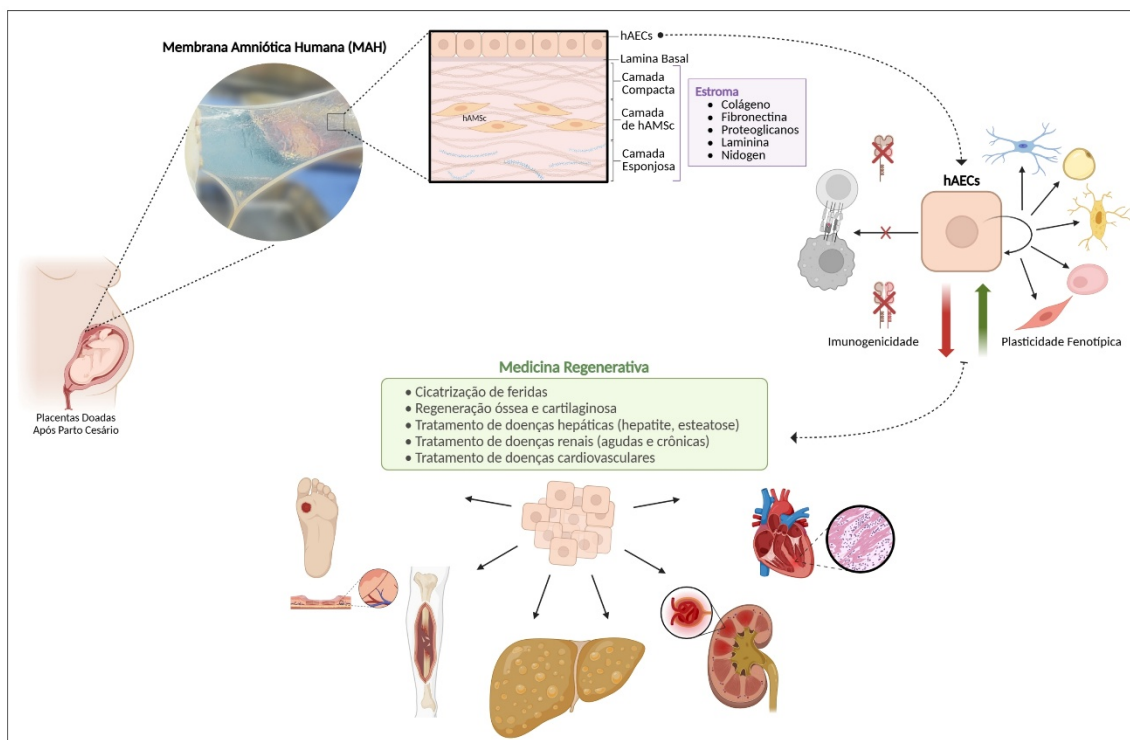


Figura 1: Origem e Aplicações das Células-tronco Epiteliais (hAECs) de Membrana Amniótica Humana (MAH). Criado em <https://BioRender.com>

Objetivo

Avaliar a influência de diferentes filmes na adesão, proliferação e viabilidade

celular em culturas primárias de hAECs.

Métodos

Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos: Controle - CTL, meio de cultura; Soro Fetal Bovino – SFB; Poli-L-lisina – PLL; Gelatina – GEL, 0,2%; e Albumina – BSA, 10 µg/mL. Placas de 24 poços foram preparadas com 300 µL de solução por poço para SFB, PLL, GEL e BSA, em triplicata, e incubadas a 37°C, 5% CO₂, por 24h. No dia seguinte, o excesso de solução foi aspirado e as placas foram deixadas para secar por 1h em fluxo laminar sob luz UV, permitindo a formação dos filmes. Células hAECs de primeira passagem foram descongeladas, quantificadas e semeadas a $2-4 \times 10.000$ células/cm². Os grupos experimentais foram comparados nos tempos de 24h e 72h quanto à viabilidade celular, número de células vivas e total de células por poço, via ensaio de exclusão por azul de tripan (figura 2). A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Também foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparações entre tempos ($p < 0,10$).

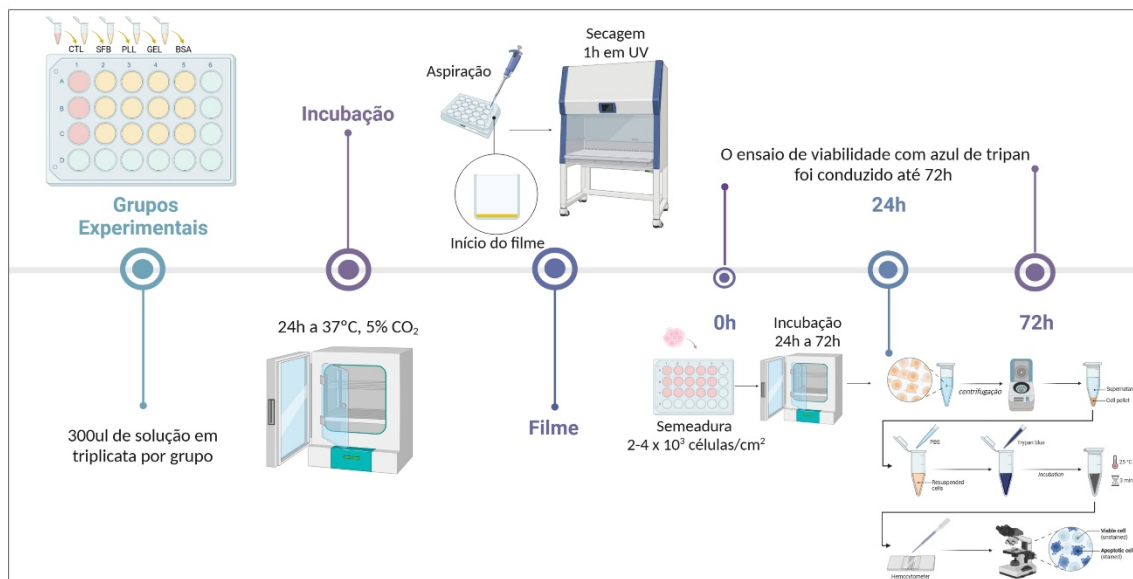


Figura 2: Determinação dos 5 grupos experimentais e ensaio de viabilidade celular por ensaio de exclusão por azul de tripan. Controle, meio de cultura - CTL ; Soro Fetal Bovino - SFB; Poli-L-lisina - PLL; Gelatina 0,2% - GEL; Albumina 10 µg/mL - BSA. Criado em <https://BioRender.com>

Resultados

O grupo PLL em 24h apresentou diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular em relação ao grupo controle ($p = 0,10$). Além disso, esse mesmo grupo demonstrou uma tendência de aumento no número de células

vivas ($p = 0,121$), sugerindo um possível efeito positivo do tratamento. Nos demais grupos e tempos avaliados, não foram observadas diferenças significativas em comparação ao controle (figura 3).

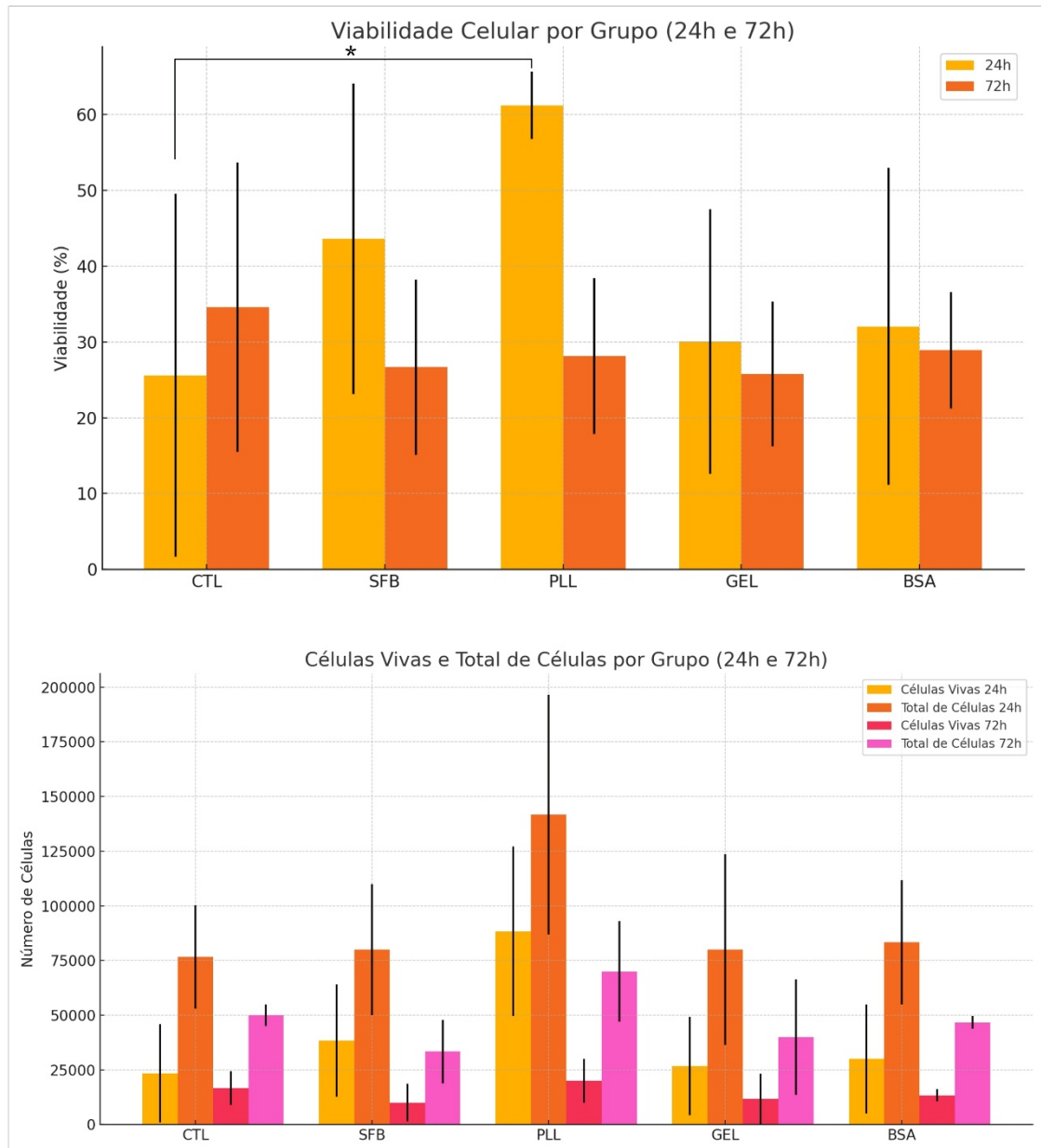


Figura 3: Viabilidade celular, células vivas e total de células por grupo em 24 e 72 horas. Controle, meio de cultura - (CTL); Soro Fetal Bovino (SFB); Poli-L-lisina (PLL); Gelatina 0,2% (GEL); Albumina 10 µg/mL (BSA). Dados expressam média ±DVP.

Conclusão

Esses dados indicam que o filme de Poli-L-Lisina pode ser uma estratégia promissora para promover a adesão celular de hAECs.

Referências

1. Miki T, Marongiu F, Ellis E, C Strom S. Isolation of amniotic epithelial stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2007 Nov;Chapter 1:Unit 1E.3.
2. Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2010 Jan;Chapter 1:Unit 1E.3.
3. Motedayyeh H, Esmaeil N, Tajik N, Khadem F, Ghotloo S, Khani B, Rezaei A. Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. BMC Res Notes. 2017 Nov 2;10(1):552.