



DETERMINAÇÃO DA DIMENSÃO FRACTAL DE CÉLULAS VERO CULTIVADAS EM MODELO À BASE DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Túlio Faustino^{1*}, Eduardo Muniz², Wyndly Gaião¹, Cláudio Rodrigues¹, Paloma Medeiros^{1,2}

¹Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov, UFPE;

²Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia, UFPE.

*Tulioqfaustino@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Diversos processos da natureza são classificados como dinâmicos e para se desenvolverem, dependem da capacidade de repetir os passos de seus antecessores, em função da praticidade assim como pela economia. Este processo de repetição necessita de um modelo para dar forma a seus produtos, que deverão ter a capacidade de repassar a informação. Em função do exposto, a conotação de repetição recebe o nome de iteração; o modelo é chamado de autossimilar; o produto se conhece como fragmento; e ao moto que sustenta este processo designa-se como atrator; dessa conjugação surge o termo fractal (MANDELBROT, 1983). Neste contexto, tem sido referido que padrões de crescimento de células normais e cancerosas foram caracterizados medindo-se suas dimensões fractais, possibilitando uma abordagem quantitativa a ser utilizada no diagnóstico de alterações morfológicas a partir da análise de imagens (VILELA *et al.*, 1995). Desta forma, modelos bi ou tridimensionais são capazes de influenciar a dinâmica de crescimento das células, bem como a cinética de agregação das mesmas (STEVENS; GEORGE, 2005). A linhagem de células Vero origina-se do epitélio renal do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e tem sido considerada um padrão internacional para estudos de biocompatibilidade com biomateriais (BAJADA, 2008; MAGER *et al.*, 2011). Estudos com biomateriais preconizam, em primeira instância, avaliar a biocompatibilidade dos mesmos. Visto que, a geometria fractal envolve um conceito de interpretação da evolução dos sistemas dinâmicos, tanto por seu padrão repetitivo de evolução quanto por adotar dimensões em números fracionários, em oposição às dimensões em números inteiros da geometria euclidiana; objetivou-se com o presente trabalho determinar, pela primeira vez, a dimensão fractal da distribuição de células Vero cultivadas em membranas de biopolímero de cana-de-açúcar (BCA).

MATERIAIS E MÉTODOS

As membranas de biopolímero de cana-de-açúcar (BCA) foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa com Biopolímeros de Cana-de-Açúcar do Centro de Cirurgia Experimental do Hospital das Clínicas-CCS/UFPE (Figura 1B). As células Vero foram descongeladas em banho-maria e posteriormente, centrifugadas sob refrigeração. O *pellet* celular foi ressuspensionado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mistura de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As células foram cultivadas e mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C e 85 % de umidade. Posteriormente, as células Vero foram contadas e plaqueadas (1 x 10⁵ células/mL) em garrafas de 25 cm² na ausência do BCA. Após a realização dos

primeiros repiques, metade dessas células, também, foi distribuída em garrafas de cultura revestidas com as biomembranas. Realizou-se a análise morfológica das células Vero em 24, 48 e 72 horas de cultivo, com auxílio de microscópio invertido com contraste de fase (LEICA) acoplado a câmera digital (MOTICAM 2.000 de 1,2 Mega Pixel) e para captura das fotomicrografias utilizou-se o software Motic Images Plus 2.0 ML instalado em um microcomputador (Figura 1A). A figura 1 C representa o assaolho de uma garrafa de cultura revestida com a membrana porosa de BCA e a figura 1 D, representa uma garrafa de cultura contendo a membrana de BCA e células imersas em meio DMEM.

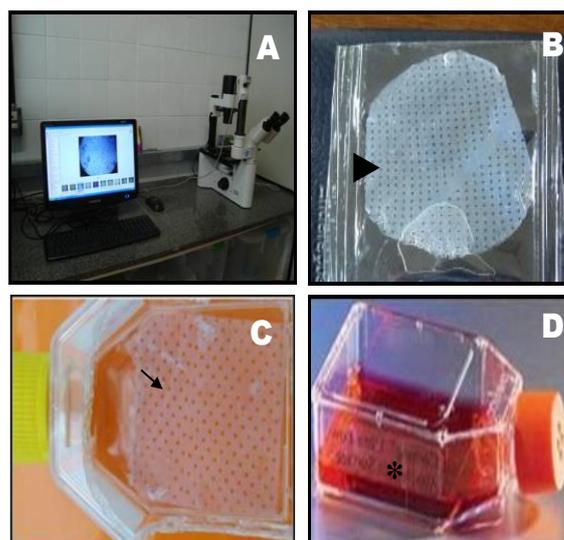


Figura 1. Montagem empregada para aquisição das imagens e cultivo das células Vero. A) fotografia do sistema de vídeo-imagem com câmera (MOTICAM) acoplada a um microscópio invertido com contraste de fase (LEICA) e a um microcomputador com Software Motic Images Plus. B) Fotografia da biomembrana (biopolímero de cana-de-açúcar com poros), material vedado em embalagem de acetato de poliéster contendo álcool isopropílico em solução aquosa. C) Fotografia da garrafa de cultura com exposição da biomembrana de BCA (seta fina) e D) garrafa de cultura contendo membrana de BCA e células imersas em meio DMEM (asterisco).

A determinação da dimensão fractal das imagens das células Vero, cultivadas nas biomembranas, foi realizada com auxílio do software NIH ImageJ e seu plug-in, FracLac (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Todas as imagens foram processadas conforme o protocolo representado no seguinte esquema (Figura 2).

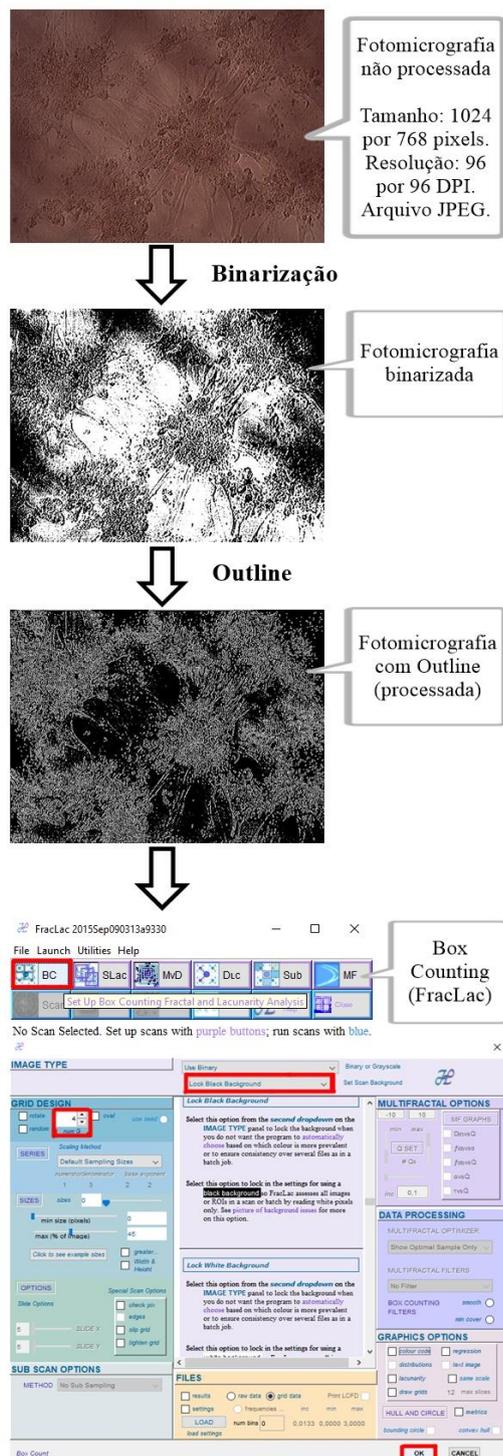


Figura 2. Esquema do protocolo para determinação da dimensão fractal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com 24 horas de cultura, foram observadas células com formas arredondadas e fibroblastóides sobre a membrana de BCA (Figura 3A). Com 48 horas, as células apresentaram-se ramificadas e bem aderidas à membrana e a região do poro, área correspondente ao plástico da garrafa de cultura (Figura 3B). Com 72 horas de cultura, as células mantiveram o arranjo ramificado, com poucos espaços entre as mesmas, sobre o biomaterial e também na área do poro (Figura 3C).

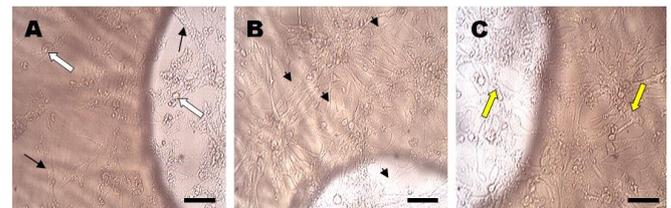


Figura 3. Fotomicrografias de células Vero cultivadas nas membranas de biopolímero de cana-de-açúcar em diferentes tempos de avaliação realizadas com auxílio de microscópio invertido com contraste de fase. A) Em 24 horas, notam-se células com formas arredondadas (setas brancas) e fibroblastóides (setas finas) sobre a membrana de BCA e na região do poro, correspondente ao plástico da garrafa. B) tendência ao arranjo ramificado com 48 horas (cabecinhas de seta) e C) com 72 horas, as células mantiveram o arranjo ramificado, com poucos espaços entre as mesmas (setas amarelas). Todas as imagens (escala de barra = 200 µm).

Cada vez mais, têm crescido o interesse por estudos relacionados ao comportamento de células em cultura, especialmente quando em contato com biomateriais; o que pode assegurar o uso dos mesmos de forma racional e segura na prática médica (REBELO, 2017). Esses modelos *in vitro* possibilitam acompanhar o crescimento das células em função de fatores como adesividade, distribuição, proliferação, diferenciação e funcionalidade; como também com relação às propriedades físico-químicas dos diferentes biomateriais (MÜLLER, 2008).

Segundo Santos e Wada (2007), a adesão é um fator relevante para a proliferação das células em contato com determinados biomateriais e a mesma tem sido considerada importante para diversos fenômenos naturais como cicatrização, manutenção estrutural dos tecidos, resposta imune e interação célula/material (PERTILE, 2007 a, b).

Nossos resultados corroboram com a caracterização morfológica mencionada na literatura, onde células fibroblastóides estão envolvidas com processos regenerativos e tendem a crescer rapidamente, secretando matriz extracelular ativamente (PLACE; EVANS; STEVENS, 2009; KUNDU et al., 2012).

Adicionalmente, observaram-se agregados celulares mais ramificados a partir de 24 horas de cultivo. A formação desses agregados reforça a expressão de moléculas de adesividade como referido por Vilela *et al.* (2003).

As células Vero cultivadas em garrafas de cultura sem e com as membranas de BCA a partir de 48 horas de cultura (Figura 4: A e B), apresentaram-se bastante ramificadas, especialmente quando em contato com o biomaterial. Notam-se agrupamentos celulares (nichos) formando firmes pontos de ancoragem (Figura 4B).

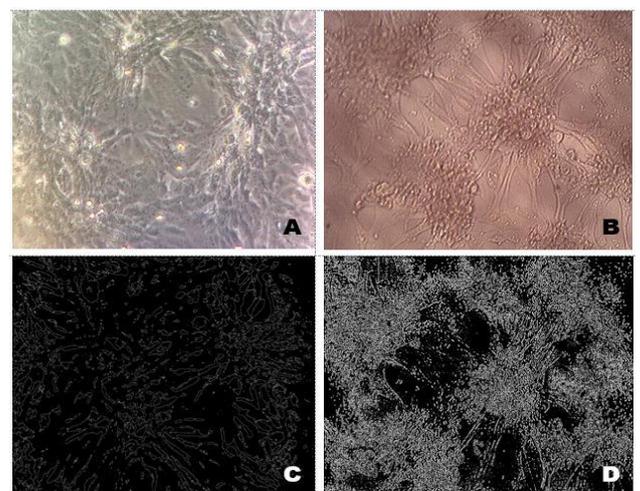


Figura 4. Fotomicrografias de células Vero cultivadas em garrafas sem e com as membranas de BCA a partir de 48 h (aumento de 100 x). A e C) células Vero cultivadas em garrafas sem o BCA, apresentam-se com forma fibroblastóide aderidas ao BCA. B e D) células Vero cultivadas em garrafas revestidas com o BCA, notam-se agrupamentos celulares (nichos) formando firmes pontos de ancoragem.

Através da análise fractal utilizando-se o método de contagem de caixas observamos que o padrão de crescimento das células Vero não se faz de forma aleatória. Deve-se levar em conta, que modelos de cultura celular têm-se tornando prevalentes nas respostas dos tecidos aos diferentes tipos de implantes (BARBANTI, 2005) e que os métodos *in vitro* podem reduzir a extensão de testes em animais, com significativa redução do tempo e do custo das análises (KUMARI *et al.*, 2002; SANTOS; WADA, 2007; BASKETTER *et al.*, 2012; VICTAL *et al.*, 2014).

A análise da morfologia celular pela utilização de métodos fractais tem envolvido conceitos de dimensionalidade, lacunaridade e multifractalidade e todos visam estabelecer a ligação entre estrutura e função (SMITH Jr *et al.*, 1996; Vilela *et al.*, 2003).

O valor da dimensão fractal das células Vero cultivadas nas membranas de BCA foi maior que o valor obtido para aquelas cultivadas em contato com o plástico das garrafas de cultura (Tabela 1).

Tabela 1: Dimensão fractal das células Vero em diferentes suportes

Suportes	Dimensão Fractal
Plástico	1,776 ± 0,015 (n = 30)
BCA	1,862 ± 0,033 (n = 29) *

Valores expressos como média ± desvio padrão.

* $p < 0,05$ (Teste-t de Student).

O aumento na dimensão fractal observado para o grupo de células cultivadas nas membranas de BCA correlaciona-se com o aumento na percepção da complexidade morfológica.

Huergo *et al* (2010) referiram a dimensão fractal, frente a uma forma de propagação radial de colônias de células Vero igual a $1,3 \pm 0,1$, determinada pelo método de contagem de caixas, e correlacionaram essa dinâmica de comportamento em função dos padrões de crescimento e mudanças na ordem de domínios como tamanho e modificações na forma das mesmas. Nesse estudo ressaltou-se que a dinâmica de crescimento de colônias de células Vero foi provavelmente determinada pelo aparecimento aleatório de células na interface das colônias.

Os aglomerados celulares possivelmente podem resultar da capacidade das células Vero em secretarem componentes da matriz extracelular, o que induziria a aproximação das mesmas. Segundo Santos *et al.* (2003) a atividade metabólica dessas células estaria aumentada em função da interação com o biomaterial.

Medeiros *et al* (2008) e Barros (2013) mencionaram o biopolímero de cana-de-açúcar (BCA) como um suporte adequado para a cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs), as quais se apresentaram com aspecto fibroblástico. Além disso, o BCA foi capaz de sustentar o crescimento das CTMs, favorecendo a remodelação citoplasmática, assim como proporcionando um ambiente adequado para a diferenciação dessas células em queratinócitos (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Neste contexto, faz-se necessário ampliarmos a investigação para melhor caracterizar a forma de ancoragem das células Vero nas biomembranas de BCA e tentarmos correlacionar a funcionalidade das mesmas através da avaliação da dimensão fractal da distribuição dessas células sobre o referido biomaterial. Mais estudos precisam ser realizados para esclarecermos sobre os conceitos de dimensionalidade, lacunaridade e multifractalidade com relação à ligação entre estrutura e função; reforçando-se dessa forma a questão de sua aplicabilidade nos diferentes processos de regeneração tecidual.

CONCLUSÕES

O biopolímero de cana-de-açúcar induziu aumento da dimensão fractal das células Vero, e este acréscimo refletiu maior complexidade morfológica e organizacional destas células

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, P.H.C.; DIAS, M.R.P.; AGUIAR, J.L.A.; SILVA, M.B.; SILVA, E.C.; MEDEIROS, P.L. Differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cords in keratinocytes on biomembranes of sugarcane. *Revista Enfermagem atual in Derme*, v. 68, p. 19-21, 2014.
- BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J., et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 2, p. 169-183, 2008.
- BARBANTI, S.; ZAVAGLIA, C.; DUEK. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 13-21, 2005.
- BASKETTER, D.A.; CLEWELL, H.; KIMBER, I. et al. 2012. A road-map for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing-t4 report*. *ALTEX*, v. 29, p. 3-91, 2012.
- BARROS, L.A. Aspectos morfofuncionais de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano cultivadas sobre matrizes tridimensionais de biopolímero de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. *Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE*, pp. 76, 2013.
- CASTRO, C.M.M.B.; AGUIAR, J.L.A.; MELO, F.A.D.; SILVA, W.T.F.; MARQUES, E.; SILVA, D.B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.* v. 49, n.2, p. 119-123, 2004.
- HUERGO, M.A.C.; PASQUALE, M.A.; BOLZÁN, A.E.; ARVIA, A.J.; GONZÁLEZ, P.H. Phenomenological study of the growth rate of transformed Vero cells, changes in the growth mode and fractal behaviour of colony contours. *Biomaterials*, v. 2009, p. 32-44, 2010.
- KUMARI, T.V.; VASUDEV, U.; KUMAR, A.; MENON, B. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, v. 15, n. 2, p. 37-41, 2002.
- KUNDU, B.; RAJKHOWA, R.; KUNDU, S.C.; WANG, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 4, p. 457-470, 2012.
- LIMA, F.R.; LIMA, J.R.A.; HIRAKAWA, P.; MEDEIROS J.R., M.D.; LIMA, F.M.T.; AGUIAR, J.L.A. Resposta inflamatória a biomembranas de polímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, v. 50, n. 1, p. 37-39, 2005.
- MAGER, M.D.; LA POINTE, V.; STEVENS, M.M. Exploring and exploiting chemistry at the cell surface. *Nature*, v. 3, p. 582-589, 2011.
- MANDELBROT, B.B. 1983. The fractal geometry of nature. *New York: Freeman*.
- MEDEIROS, P.L.; SILVA, E.C.; RAYOL, C.; SANTOS, N.P.S.; KRASILNIKOV, O.; AGUIAR, J.L.A. Gel de biopolímero de cana-de-açúcar como suporte para cultivo de células-tronco de cordão umbilical humano. *Anais da FeSBE*, 2008.
- MÜLLER, U. *In vitro* biocompatibility testing of biomaterials and medical device. *Medicine Device Technology*, v. 19, n. 2, p. 32-34, 2008.
- PERTILE, R.A.N. Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina*, 2007a.

- PERTILE, R.A.N.; SIQUEIRA JR, J.M.; RAMBO, C.R.; BERTI, F.V.; DO VALLE, R.M.R.; PORTO, L.M. Interação de culturas celulares com suportes biopoliméricos para aplicações biomédicas. *Exact.*, v. 5, n. 2, p. 343-352, 2007b.
- PLACE, E.S.; EVANS, N.D.; STEVENS, M.M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, v.8, n. 6, p. 457-470, 2009.
- REBELO, R.; FERNANDES, M.; FANGUEIRO, R. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*, vol. 200, p. 236-243, 2017.
- SANTOS JR., A.R., WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, n 4, p. 308-317, 2007.
- SILVEIRA, A.A.; DANTAS, M.L.M.; ALMEIDA, Y.M.B.; AGUIAR, J.L.A. Estudo biomecânico de membranas de biopolímero de cana-de-açúcar perfuradas e contínuas implantadas no celular subcutâneo da parede abdominal de ratos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, v. 52, n.1, p. 55-59, 2007.
- SMITH JR, T.G.; LANGE, G.D.; MARKS, W.B. Fractal methods and results in cellular morphology-dimensions, lacunarity and multifractals. *Journal of Neuroscience Methods*, n. 69, p. 123-136, 1996.
- STEVENS, M.M.; GEORGE, J.H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science*, v. 310, p. 1135-1138, 2005.
- VICTAL, J.C.; VALÉRIO, L.B.; OSHIRO, M.C.; BAPTISTA, S.C.; PINHEIRO, F. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 7, n. 2, p. 36-57, 2014.
- VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; MENDES, R.L.; SANTOS, A.A. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, p. 67-72, 2003.
- WÜNSCHE, S. et al. Phenotypically and karyotypically distinct Madin-Darby canine Kidney cell clones respond differently to alkaline stress. *Journal of Cellular Physiology*, v. 164, p. 164, 1995.

*Apoio financeiro: CAPES, CNPq, UFPE.