

# ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS HUMANOS DERMIS CULTIVADOS EM MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA COMPÓSITAS COM ALOE VERA

L. PIAIA<sup>1</sup>, C. Q. PAES<sup>1</sup>, F. V. BERTI<sup>1</sup> e L. M. PORTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina,  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
E-mail para contato: {lya, luismar}@intelab.ufsc.br

**RESUMO** - A incorporação de princípios bioativos extraídos da planta *Aloe vera* pode ser realizada *in situ* durante a produção de celulose bacteriana, proporcionando um aumento na funcionalidade dos hidrogéis de celulose bacteriana (CB) quando aplicados como *scaffolds* na Engenharia de Tecidos. Neste trabalho avaliou-se a atividade metabólica de fibroblastos humanos dermais cultivados *in vitro* nas membranas de CB-Aloe. Para tanto, MEV foi realizado a fim de avaliar a morfologia celular. A citotoxicidade foi avaliada através da análise de MTS e Live/Dead®. Não foram observados efeitos citotóxicos e houveram mudanças morfológicas significativas devido à adesão das células nas fibras do *scaffold*. Tais achados demonstram que as alterações morfológicas observadas no citoesqueleto dos fibroblastos são correspondentes à boa adaptação no biomaterial.

## 1. INTRODUÇÃO

Na engenharia de tecidos estão sendo desenvolvidos novos biomateriais, visando melhorar *scaffolds* que possam ser utilizados como substitutos de órgãos e tecidos, para promover a restauração das funções nativas dos mesmos (Naderi *et al.*, 2011). Estes *scaffolds* podem ser utilizados como suportes na reconstrução e mimetização de microambientes celulares (Fu *et al.*, 2013). No caso do desenvolvimento de substitutos para a pele os *scaffolds* servem como ‘guias’ para as células, favorecendo a adesão, crescimento e diferenciação celular, formando assim uma pele funcional e um tecido estruturado (Zhong *et al.*, 2010).

Os biomateriais que vem sendo desenvolvidos em engenharia de tecidos são quimicamente diversificados como, por exemplo: a poli(ε-caprolactona), a quitosana, o colágeno, a quitina, a elastina, a gelatina, o ácido hialurônico, dentre outros como a celulose bacteriana (Koide *et al.*, 1993;1999; Badylak, 2007). A celulose bacteriana (CB) é um polímero natural, que apresenta fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , com ligações β-(1,4), nas quais estão ligadas unidades de D-glicose que possuem interação intramolecular entre o oxigênio e hidrogênio, através de ligações do tipo pontes de hidrogênio (Sjostrom, 1993).

A bactéria que possui capacidade de síntese de CB é conhecida como *Gluconacetobacter*. Quando for cultivada em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono como, por exemplo: manitol, glicose, sacarose e glicerol excreta nanofibras de celulose pura. Deste modo esta bactéria possibilita a formação de membranas (hidrogéis) com propriedades físicas e químicas

particulares que dependem da composição do meio de cultura. Estas propriedades estão relacionadas à estrutura organizacional das nanofibras de celulose ao longo de sua produção (Haigler *et al.*, 1982; Hutchens *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, das suas propriedades mecânicas.

A celulose produzida extracelularmente apresenta características peculiares, as quais indicam um grande potencial para ser utilizada como biomaterial de engenharia tecidual, medicina regenerativa e outras aplicações biomédicas. A CB é um polímero puro, ultra-fino, que possui uma rede aleatória de fibras, estrutura de rede cristalina única, em nano-escala tridimensional, bem como alta capacidade de absorção de água, resistência mecânica e flexibilidade (Czaja *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2013). Além disso, este material apresenta estrutura variada e com poder de reter 99% de água em seu peso total (Schrecker and Gostomski, 2005).

Estudos vêm sendo desenvolvidos para aperfeiçoar as propriedades e o uso da CB; portanto, a incorporação de agentes químicos e/ou biológicos nas etapas de produção deste biomaterial pode aumentar o seu espectro de aplicação, melhorando suas propriedades físico-químicas (Chen *et al.*, 2010).

A *Aloe vera*, também conhecida como babosa, possui inúmeras moléculas bioativas em sua composição, com potencial para ser utilizada na cicatrização de feridas. A penetração do gel de *Aloe vera* no tecido lesionado pode impedir o crescimento de bactérias, fungos e vírus, pois este gel tem poder antiinflamatório e imunoregulador (Hutter *et al.*, 1996; Das *et al.*, 2011).

Em função das inúmeras propriedades promissoras da celulose bacteriana e da *Aloe vera*, novos biomateriais foram produzidos em nosso laboratório com base na combinação CB-Aloe. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade metabólica dos fibroblastos humanos da derme cultivadas *in vitro* nas membranas de CB-Aloe.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Produção de membranas de celulose bacteriana**

As membranas de CB foram produzidas utilizando inóculo da bactéria *G. hansenii* ATCC 23769, obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)", da Fundação André Tosello, Campinas - SP. O inóculo foi produzido três dias antes do início dos experimentos; assim, obteve-se uma solução de inóculo estoque, cuja adição, à base de 10 % (v/v), ao meio de cultura, permitiu a produção de diversas membranas. O meio Manitol foi utilizado para cultivo das membranas (CB) sendo que o mesmo contém: 25 g de manitol, 5 g de extrato de levedura e 3 g de peptona diluídos em 1 l de água destilada. O pH do meio foi ajustado em 6,6 e esterilizado por autoclavagem no período de 20 minutos a 121°C. As membranas de CB foram produzidas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Switzerland) sendo que em cada poço foram adicionados 1000 µl da solução de inóculo e meio de cultura manitol. As placas de cultura de 24 poços foram mantidas em cultura estática à temperatura de 25°C, por um período de dez dias. Após o décimo dia, as membranas de CB que cresceram na interface líquido/ar de cada poço de cultura foram então removidas para início do processo de purificação.

## 2.2. Produção, purificação e esterilização das membranas de celulose bacteriana com frações de *Aloe vera* (CB-Aloe)

A produção da CB-Aloe foi realizada conforme descrito na Seção 2.1. Contudo, modificações nas proporções de volume de meio com diferentes soluções do extrato de *Aloe vera* na proporção foram também consideradas. Formando desta forma três membranas distintas, definidas como: CB-Gel, CB-Gel Total, CB-FP1. A membrana CB-Gel é formada por uma solução de gel do extrato de *Aloe vera* sem as fibras. Já A membrana CB-GelTotal é formada por uma solução do extrato de *Aloe vera* com as fibras. Por fim a membrana CB-FP1 é formada por uma solução 1 g.L<sup>-1</sup> de FP1 ( solução de gel do extrato de *Aloe vera* deixado em solução com álcool etílico por 24 horas. O floculado então autoclado e liofilizado).

Solução de 60% de cada destas soluções, com 10% de meio e meio manitol foram então homogeneizadas e adicionadas nas placas de cultura de 24 poços; em cada poço, o volume final foi de 1000 µl. Finalizados dez dias de cultura bacteriana houve a formação de membranas de CB e CB-Aloe na interface líquido/ar de cada poço de cultura; as mesmas foram transferidas para um frasco que continha uma solução de NaOH 0,1M, e mantidas em NaOH por 24 h a 50°C para remoção de bactérias e/ou resíduos, que poderiam estar retidos nas redes de nanofibras da celulose bacteriana. Em seguida as membranas foram lavadas três vezes com água destilada; na última lavagem o pH foi ajustado para 7 e as membranas de CB e CB-Aloe foram então esterilizadas por autoclavagem por um período de 20 min a 121°C, e mantidas em local protegido até utilização nos experimentos de cultura de células.

## 2.3. Culturas de células de fibroblastos dermais humanos adultos (HDFa)

A dispersão da cultura de células de fibroblastos dermais humano adultos (HDFa) (Invitrogen) foi mantida em meio de cultura celular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina em atmosfera úmida, a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>), utilizando uma densidade celular de ~2,5 × 10<sup>4</sup> cells.cm<sup>-2</sup> em cada placa de petri (TPP, Switzerland) para propagação celular. As células HDFa foram utilizadas nas passagens de 5 a 9.

## 2.4. Atividade metabólica e proliferação celular

A atividade metabólica e a proliferação foram determinadas pela atividade mitocondrial das células através do ensaio colorimétrico do MTS (Promega). O ensaio de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] é um método utilizado para determinar a atividade metabólica. As células de HDFa foram semeadas na superfície mais porosa das membranas em estudo (CB, CB-Gel, CB-Gel Total, CB-FP1), cultivadas na densidade de 10<sup>5</sup> células/membrana. A atividade metabólica e proliferação celular foram avaliadas em função do tempo, para 1, 2, 3, 7 e 20 dias de cultura. Para cada tempo avaliado no ensaio do MTS, o meio de cultura era removido, as amostras lavadas três vezes com PBS e transferidas para uma nova placa de cultura. Então, 300 µl de meio de cultura e 60 µl do reagente MTS foram adicionados em cada poço da placa de cultura com as amostras. As placas de cultura eram incubadas por 1 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e, logo após, a solução era homogeneizada e 100 µl da solução de cada amostra eram transferidos para uma nova placa de cultura de 96 poços. A leitura da absorbância da solução a 490 nm foi analisada em leitor de microplacas

(Thermo Plate - TP Reader). Paralelamente ao ensaio de MTS foi realizada a análise qualitativa do ensaio Live/Dead®. O kit Live/Dead® Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) é utilizado somente com células de mamíferos, e mede a atividade intracelular das esterases (calceína) e a integridade da membrana plasmática (homodímero de etídio). Uma solução A constituída por calceína: homodímero de etídio (4:1) em PBS foi preparada e 100 µl desta solução foram adicionados sobre cada amostra. Logo após, a placa de cultura foi incubada por 30 minutos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e, após incubação, as amostras foram montadas em lâminas e visualizadas no microscópio de fluorescência (Eclipse Ci-L, Nikon, Japão).

## 2.5. Morfologia e adesão celular

A morfologia das membranas CB-Aloe e a capacidade de adesão das células de fibroblastos humanos da derme cultivadas nas membranas CB-Aloe foram avaliadas utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. As membranas foram secas por ponto crítico, foram distribuídas sobre fitas de carbono que estavam aderidas sobre os *stubs* e então recobertas com uma camada dupla de ouro. Após recobrimento, as amostras foram analisadas por MEV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC), utilizando o equipamento JEOL JSM - 6390LV.

## 2.6. Análise estatística

As comparações entre os grupos foram analisadas pela variância one-way, ANOVA, seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. Microestrutura das membranas CB-Aloe sem adesão celular

A Figura 1 mostra micrografias das membranas CB-Aloe produzidas de modo estático. Pode-se observar que a estrutura da CB (a) e CB-Aloe (b, c, d) possui em sua extensão uma rede de fibras entrelaçadas com diferentes porosidades, organizadas de forma randômica.

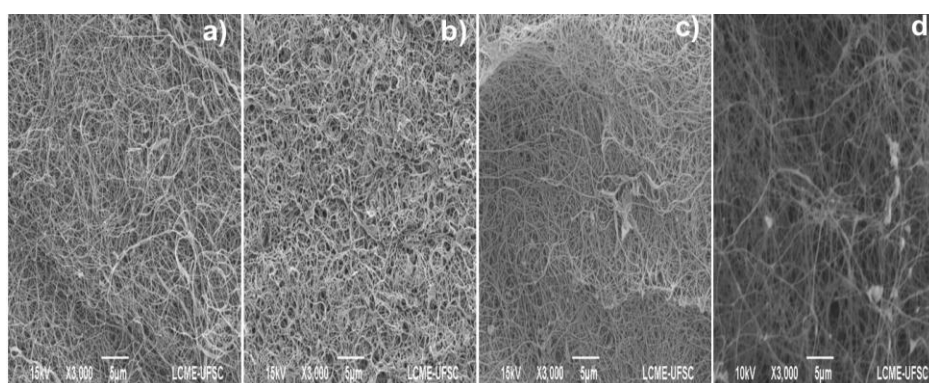


Figura 1 – Micrografias das membranas CB-Aloe. a) CB, b) CB-Gel, c) CB-Gel Total e d) CB-FP1. Membranas com fração de 60% de *Aloe vera*. Imagens amplificadas 3000 ×.

### 3.2. Atividade metabólica e proliferação celular

Os ensaios de atividade metabólica e proliferação celular foram realizados com células da derme humana *in vitro* avaliando-se o comportamento celular em até 20 dias de cultura. Os resultados obtidos nestes ensaios são mostrados na Figura 2.

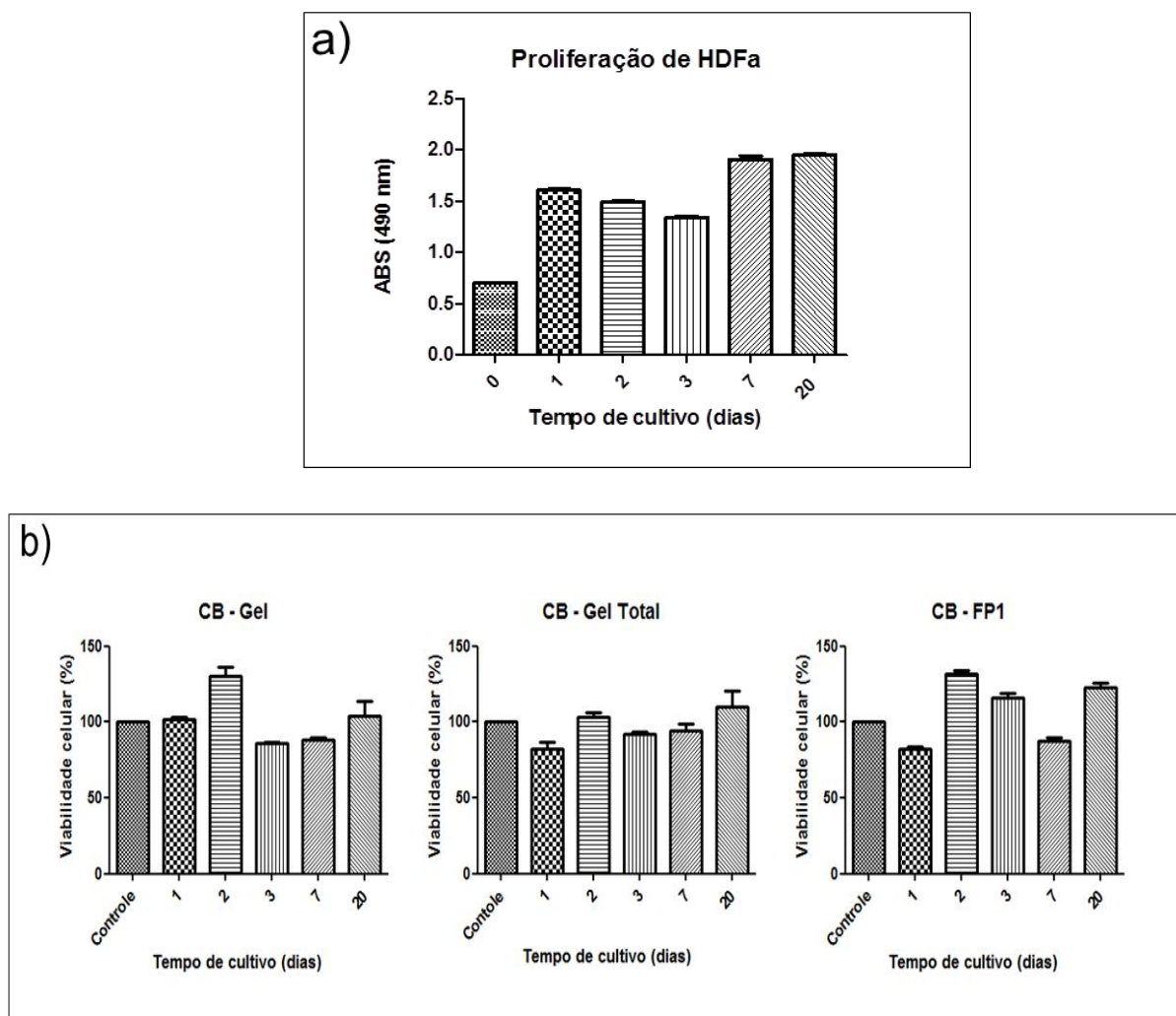


Figura 2 – (a) Proliferação celular de células epiteliais, fibroblastos (HDFa), na placa de cultura, no período total de 20 dias. (b) Viabilidade de HDFa em membranas de CB, CB-Gel, CB-Gel Total, CB-FP1, avaliadas por MTS para 1, 2, 3, 7 e 20 dias.

A atividade metabólica e proliferação das células HDFa cultivadas na placa estão mostradas na Figura 2 (a). Pode-se observar que a atividade metabólica e proliferação das HDFa se mantêm por 20 dias quando cultivadas em placas de cultura. Observa-se que a atividade metabólica diminui a partir do primeiro dia até o terceiro dia de cultura. Após 7 dias de cultura as células atingem uma taxa de atividade metabólica que permanece constante até o vigésimo dia de cultura. Após analisar o comportamento destas células em placas de cultura cultivou-se as HDFa na superfície porosa das membranas de CB-Aloe.



A Figura 2 (b) mostra os resultados da atividade metabólica e proliferação das HDFa cultivadas na superfície porosa das membranas de CB-Aloe com distintas composições, obtidos em 20 dias de cultura, com barras de erro ( $n = 4$ ). Identifica-se que a atividade metabólica da HDFa na CB-Aloe estão acima de 80% ao longo do tempo de cultivo. Analisando a CB-Gel podemos identificar que após o segundo dia de cultura a atividade metabólica diminuiu. Posteriormente esta atividade metabólica aumenta até o último dia de cultura. Este comportamento foi observado também na CB-Gel Total. Contudo, com a CB-FP1 a atividade metabólica após o segundo dia de cultura foi diminuída, mantendo-se até constante até o sétimo dia; posteriormente, ocorreu um aumento desta atividade. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas no segundo e terceiro dias de cultivo para as membranas CB-Gel e CB-FP1.

A viabilidade das HDFa cultivadas nas membranas CB-Aloe foi comprovada qualitativamente através do ensaio Live/Dead®, mostrado na Figura 3.

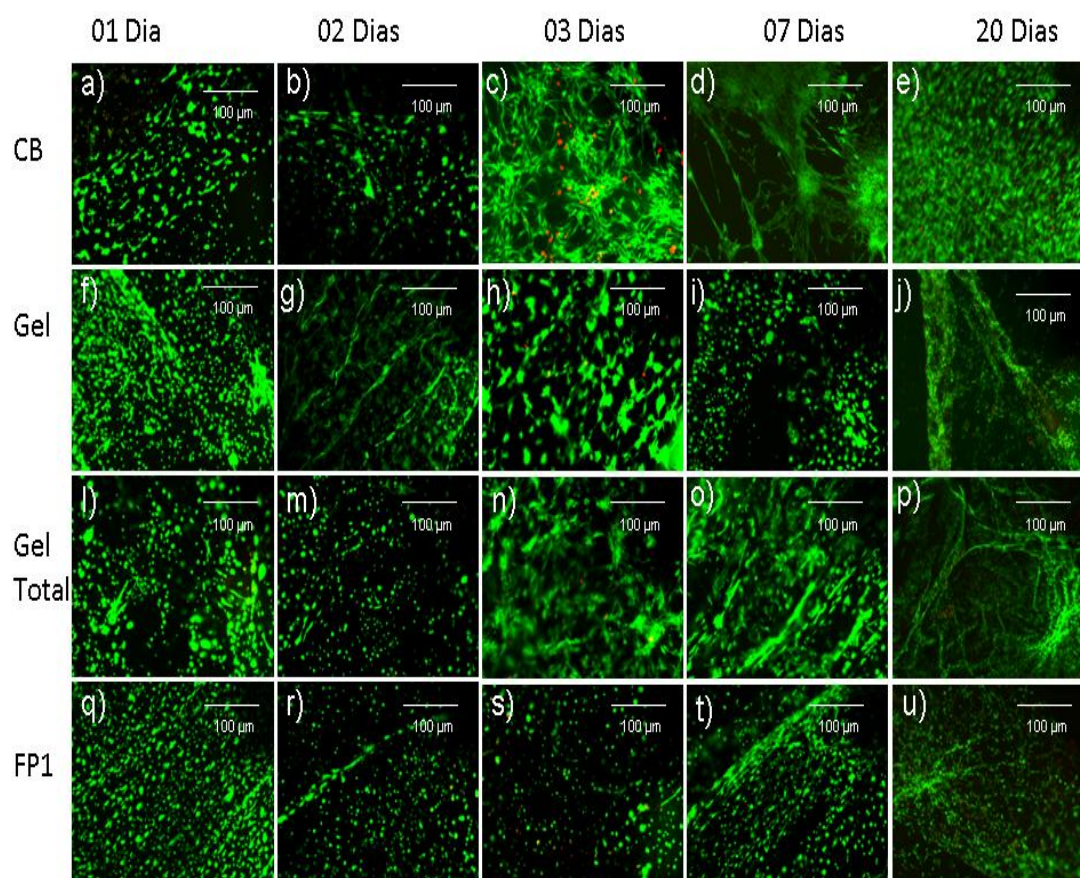


Figura 3 – Viabilidade das células de HDFa, utilizando o kit Live/Dead®. Em verde (calceína) podem ser visualizadas as células viáveis e em vermelho (homodímero de etídio) as células mortas.

Na Figura 3 podemos identificar qualitativamente, pelas imagens obtidas do ensaio com o kit Live/Dead®, a viabilidade referente à CB-Aloe ao longo do tempo de experimento. Estes resultados comprovam os resultados de MTS e demonstra a boa à viabilidade celular nestas membranas.

### 3.4. Adesão e morfologia celular

A adesão e a morfologia das células HDFa foram avaliadas utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). O resultado pode ser observado na Figura 4.

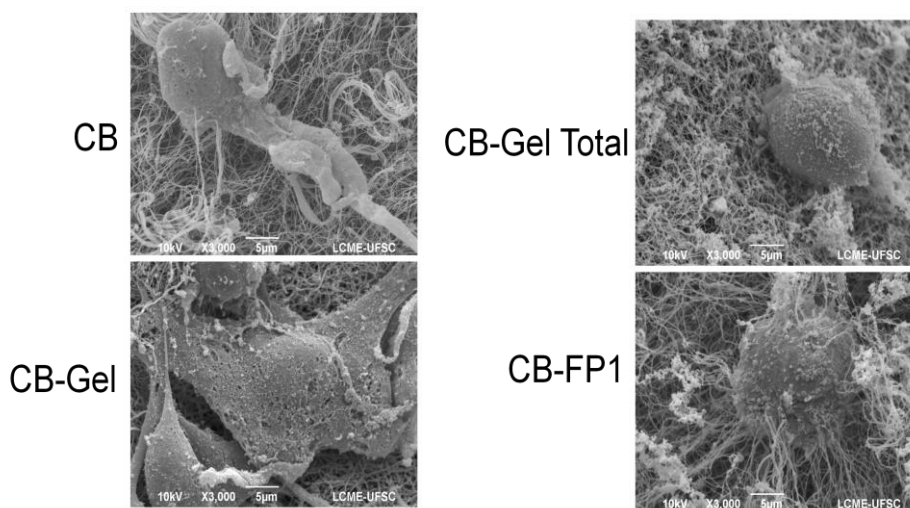


Figura 4 – Morfologia e adesão de células HDFa cultivadas nas membranas CB-Aloe. Como ilustrado na figura, temos: (a) CB; (b) CB-Gel; (c) CB-Gel Total e (d) CB-FP1.

A Figura 4 mostra a morfologia das células HDFa no terceiro dia de cultivo. Nas imagens observamos em (a) e (b) o estado morfológico das células com comportamento natural, em forma alongada. Entretanto, nas demais membranas são mostradas imagens em que as nanofibras de celulose no compósito CB-Aloe estão entrelaçadas, fixando ainda mais a célula no biomaterial. Observa-se também que a morfologia é mais arredondada, não aderida.

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos quanto à atividade metabólica das células de fibroblastos humanos cultivados nas membranas de CB-Aloe comprovam que os materiais desenvolvidos não afetam a viabilidade celular. Através da análise qualitativa (Live/Dead®) foi possível observar que as células permanecem viáveis durante 20 dias de cultura nas membranas de CB-Aloe. As células aderidas nas membranas de CB-Aloe, e após três dias de cultura, encontram-se morfológicamente espalhadas na membrana CB-Aloe. Podemos identificar que a membrana CB-Gel demonstrou maior manutenção da viabilidade celular no período estudado.

## 5. REFERÊNCIAS

- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, v.28, n.25, p. 3587-93, 2007.
- CHEN, P.; CHO S.; JIN, H.-J. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromol. Res.*, v.18, n. 4, p. 309-320, 2010.
- CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, v.8, n.1, p.1-12, 2006.

- DAS, S.; MISHRA, B.; GILL, K.; ASHRAF, M. S.; SINGH, A. K.; SINHA, M.; SHARMA, S.; XESS, I.; DALAL, K.; SINGH, T. P.; DEY, S. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 48, n.1, p. 38-43, 2011.
- FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr. Polym.*, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.
- HAIGLER, C. H.; WHITE, A. R.; BROWN, R. M.; COOPER, K. M. Alteration of in vivo cellulose ribbon assembly by carboxymethylcellulose and other cellulose derivatives. *J. Cell Biol.*, v. 94, n. 1, p. 64-69, 1982.
- HUTCHENS, S. A.; LEÓN, R. V.; O'NEILL, H. M.; EVANS, B. R. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 44, n. 2, p. 175-180, 2007.
- HUTTER, J. A.; SALMAN, M.; STAVINOHA, W. B.; SATSANGI, N.; WILLIAMS, R. F.; STREEPER, R. T.; WEINTRAUB, S. T. Antiinflammatory C-Glucosyl Chromone from Aloe barbadensis. *J. Nat. Prod.*, v. 59, n. 5, p. 541-543, 1996.
- IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.*, v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.
- KOIDE, M.; OSAKI, K.; KONISHI, J.; OYAMADA, K.; KATAKURA, T.; TAKAHASHI, A.; YOSHIKATO, K. A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 27, n. 1, p. 79-87, 1993.
- MEVES, A.; STOCK, S. N.; BEYERLE, A.; PITTELKOW, M. R.; PEUS, H. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol. Lett.*, v. 122, n. 3, p. 205-14, 2001.
- MICHAELIS, S.; ROBELEK, R.; WEGENER, J. Studying cell-surface interactions in vitro: a survey of experimental approaches and techniques. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 126, p. 33-66, 2012.
- NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J. Biomater. Appl.*, v. 26, n. 4, p. 383-417, 2011.
- PÉREZ, R. A.; WON, J.-E.; KNOWLES, J. C.; KIM, H.-W. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, n. 0, 2013.
- SCHRECKER, S. T.; GOSTOMSKI, P. A. Determining the Water Holding Capacity of Microbial Cellulose. *Biotechnol. Lett.*, v. 27, n. 19, p. 1435-1438, 2005.
- SJOSTROM, E. Wood chemistry: fundamentals and applications, 1993.
- ZHONG, S. P.; ZHANG Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wil. Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, v. 2, n. 5, p. 510-25, 2010.