

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química
Grupo de Engenharia Genômica

**Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929
com membranas de celulose bacteriana para aplicações em
engenharia de tecidos**

RENATA APARECIDA NEDEL PÉRTILE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Florianópolis - SC, 13 de setembro de 2007.

Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos

Por

Renata Aparecida Nedel Pértile

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Dr. Carlos Renato Rambo
Coorientador, presidente

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Membro interno

Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle
Membro externo

Florianópolis, setembro de 2007.

Pértille, Renata Aparecida Nedel

**Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929
com membranas de celulose bacteriana para aplicações em
engenharia de tecidos**

75 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Engenharia de tecidos – 2. Celulose bacteriana – 3.
Linhagem celular L929 – 4. Dinâmica celular

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica, e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLAB) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

À minha família, em especial aos meus pais, Lícia e Gentil pelo incentivo, orientação e força dada em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho;

Ao professor Luismar Marques Porto, ao Dr. Carlos Renato Rambo, à professora Rosa Maria Ribeiro do Valle, ao Dr. Jarbas Motta Siqueira Junior e à Fernanda Vieira Berti, pelo apoio, dedicação, incentivo e por contribuir diretamente no desenvolvimento deste trabalho;

À Derce O. S. Recouvreux e Diogo M. de Abreu Sá por produzir as membranas de celulose bacteriana e à professora Dra. Regina Vasconcellos Antônio, responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos – LBBMM do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Aos meus amigos e colegas pelo incentivo, insistência, carinho, paciência, companheirismo e compreensão;

À CAPES pelo apoio financeiro;

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	1
ABSTRACT	2
Capítulo 1 Justificativa, Objetivos e Introdução	3
1.2 Objetivos Gerais	4
1.3 Objetivos específicos	4
1.4 Introdução	5
Capítulo 2 Revisão Bibliográfica	7
2.1. Engenharia de tecidos	7
2.2 Suportes para cultura celular (<i>Scaffolds</i>)	10
2.3. Celulose Bacteriana	13
2.4 Linhagem celular L929	18
2.5 Dinâmica celular: adesão, proliferação e migração celular	19
Capítulo 3 Materiais e Métodos	22
3.1 Celulose bacteriana	23
3.1.1 Síntese	23
3.1.2 Caracterização das membranas de celulose bacteriana	23
3.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	23
3.1.2.2 Microporosidade das Membranas	24
3.1.2.3 Absorção de água e nutrientes	24
3.1.2.4 Cristalinidade	24
3.1.2.5 Análise térmica	25
3.1.2.6 Resistência à tração	25
3.1.2.7 Molhabilidade	25
3.1.2.8 pH	26

3.1.3 Preparação das membranas para cultura celular	26
3.2 Estudo <i>in vitro</i>	27
3.2.1 Adesão	27
3.2.2 Proliferação	28
3.2.3 Viabilidade celular	28
3.2.4 Morfologia celular	28
3.2.5 Migração celular	29
Capítulo 4 Resultados e Discussão	31
4.1 Caracterização das membranas de celulose bacteriana	31
4.2 Estudo <i>in vitro</i>	42
Capítulo 5 Conclusões e Sugestões	59
5.1 Conclusões	59
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	60
Capítulo 6 Referências Bibliográficas	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conceito de Engenharia de Tecidos (adaptada de Stock e Vacanti, 2001).	8
Figura 2. Técnica da engenharia de tecidos (retirado de Barbanti <i>et al</i> , 2005)	9
Figura 3. Exemplos de <i>scaffolds</i> de fibras de seda, retirado de Karageorgiou e Kaplan (2005).	11
Figura 4. Estrutura química da celulose bacteriana (retirada de Klemm <i>et al.</i> , 2001).	14
Figura 5. Micrografia (MEV) da rede de celulose bacteriana, mostrando também as bactérias (retirada de Iguchi <i>et al.</i> , 2000).	14
Figura 6. Algumas aplicações médicas da celulose bacteriana. Adaptada de Klemm <i>et al.</i> (2001) e Czaja <i>et al.</i> (2006), a) tubos de celulose bacteriana para implantes em vasos sanguíneos, b) d) e e) Celulose bacteriana aplicada em queimaduras e c) membrana de celulose bacteriana.	16
Figura 7. Fluxograma da metodologia experimental para o estudo da interação célula-celulose bacteriana.	22
Figura 8. Representação da medida do ângulo de contato (?).	26
Figura 9. Aparato desenvolvido para analisar a migração celular.	29
Figura 10. Fotografia de uma membrana de celulose bacteriana hidratada (gel).	31
Figura 11. Micrografias (MEV) da superfície das membranas a) e b) CB1, e c) e d) CB2.	32
Figura 12. Comportamento de absorção das membranas CB1 e CB2 nas soluções de meio DMEM (10% SBF) e água destilada.	34
Figura 13. Difractometria de raios-X da membrana CB1.	35
Figura 14. Análise térmica da membrana CB1; a) termograma de DSC. O detalhe mostra a faixa de temperatura entre 31°C e 41°C; b) curva TG, com a respectiva derivada.	37
Figura 15. Curva típica de tensão-deformação da CB1 sob força de tração.	38

Figura 16. Imagem das gotas nas membranas a) CB1 e b) CB2 comercial.	40
Figura 17. Valores medidos do pH da solução: a) membranas CB1 e CB2 comercial em meio DMEM suplementado com 10% SFB e b) CB1 e CB2 comercial em água destilada.	41
Figura 18. Microscopia óptica dos fibroblastos aderidos, após 24 h de cultura: a) membrana CB1, b) controle da CB1, c) membrana CB2, b) controle da CB2..	42
Figura 19. Contagem de células aderidas nas membranas a) CB1 e b) CB2 comercial em relação a seus controles e em função do tempo de cultura.	44
Figura 20. Contagem de células aderidas na membrana CB1 e CB2 comercial	45
Figura 21. Distribuição de fator de forma celular após 24 h de cultura: a) controle; b) membrana CB1 e c) membrana CB2.	47
Figura 22. Microscopia óptica evidenciando a proliferação dos fibroblastos, após 24 h de cultura: a) na membrana CB1; b) controle da CB1; c) na membrana CB2; d) no controle da CB2.	48
Figura 23. Proliferação dos fibroblastos na membrana a) CB1 e controle e b) CB2 comercial e controle, em função do tempo de cultura.	50
Figura 24. Comparação da proliferação dos fibroblastos entre as membranas CB1 e CB2 em função do tempo de cultura.	51
Figura 25. Micrografias de MEV de cultura de fibroblastos em membrana de CB1, após 24 h de cultura. a) detalhe da superfície da membrana celulósica, b) células aderidas à membrana. A seta indica uma célula com formato de fibroblasto, c) e d) diferentes magnitudes, evidenciando o formato celular.	53
Figura 26. Micrografias de MEV de cultura de fibroblastos em membrana de CB2, após 24 h de cultura. a) detalhe da superfície da membrana celulósica, b) células aderidas à membrana, c) e d) diferentes magnitudes, evidenciando o formato celular.	54
Figura 27. Células na membrana CB1 em diferentes tempos de cultura a) 24h de adesão, b) 26 h, c) 29h e d) 42h.	55
Figura 28. Células na membrana CB2 em diferentes tempos de cultura a) 24h de adesão, b) 26h, c) 29h e d) 42h.	55

Figura 29. Dados de viabilidade celular na membrana a) CB1 e controle e b) CB2 e controle. As curvas representam ajustes da Equação 2 aos dados experimentais.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Propriedades da celulose bacteriana (T_g = temperatura de transição vítrea; T_d = temperatura de degradação).....	39
Tabela II. Valores de velocidade específica de crescimento, μ , obtidos após ajuste da Equação 2 aos dados experimentais, com os respectivos coeficientes de correlação, R^2	57

RESUMO

O estudo das interações entre células e substrato na engenharia de tecidos é de grande importância para a determinação das propriedades biológicas dos implantes. A adesão das células ao substrato influencia na morfologia, proliferação e viabilidade celular. Neste trabalho foram avaliadas a adesão, proliferação e viabilidade de fibroblastos de camundongo, linhagem L929, em suporte biopolimérico. Dois tipos de celulose bacteriana foram utilizados: uma produzida em laboratório e outra comercial (BIONEXT[®]). Os fibroblastos foram cultivados sobre as membranas em meio DMEM, suplementado com 10% de SBF a 37°C, contendo 5% CO₂, e diferentes parâmetros celulares foram escolhidos com o objetivo de monitorar e avaliar o comportamento das células em diferentes tempos de cultivo nas membranas. Foram observadas diferenças morfológicas significativas nas células. Os fibroblastos permaneceram com morfologia arredondada. A celulose bacteriana permitiu a adesão, crescimento, proliferação e viabilidade das células.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos, interação célula-biopolímero, dinâmica celular, celulose bacteriana.

ABSTRACT

The study of the dynamic behavior and adhesion between cells and substrates in tissue engineering is of major importance to predict the final biological properties of tissue implants. The adhesion of cells on the substrate influences morphology, proliferation and cellular viability. In this work, adhesion, proliferation and viability of L929 mouse fibroblasts on bacterial cellulose (BC) membranes were evaluated *in vitro*. Two kinds of cellulose membranes were used; a produced in the laboratory and a commercially available (BIONEXT®). Fibroblasts were cultivated on the membranes in a DMEM medium supplemented with 10% of SBF at 37°C, containing 5% of CO₂, and different cellular parameters were chosen to evaluate the cell behavior on the membranes in function of time. Significant morphologic differences were observed in the cells. Although the fibroblasts were well adhered to the membrane, they maintained a round-shape. Bacterial cellulose membranes allowed cell adhesion, growth, proliferation and viability.

Keywords: Tissue engineering, cell-biopolymer interaction, cell dynamics, bacterial cellulose.

Capítulo 1

Motivação e Justificativa, Objetivos e Introdução

1.1 Motivação e Justificativa

O desenvolvimento da área de engenharia de tecidos, visando a cura e regeneração dos tecidos biológicos e a produção de tecidos artificiais necessita diretamente do desenvolvimento de novos materiais com alta biocompatibilidade e do aprimoramento de técnicas de cultivo e análise de células nas estruturas tridimensionais complexas que formam os tecidos.

Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, há a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais, para que haja a otimização dos produtos biomédicos, e uma colaboração efetiva para os processos de regeneração tecidual e no aumento da biocompatibilidade dos materiais, buscando sempre a diminuição dos problemas referentes aos implantes biomédicos.

A investigação sistemática das propriedades físico-químicas de biopolímeros, como a celulose bacteriana, e sua interação com diferentes linhagens celulares podem gerar novas e abrangentes linhas de pesquisa em biomedicina. Notadamente, grupos interdisciplinares de pesquisa, como o INTELAB-UFSC, poderão gerar avanços tecnológicos que permitirão a consolidação de linhas de pesquisa voltadas à Engenharia de Tecidos.

1.2 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo avaliar a celulose bacteriana como suporte em cultura de células e sua influência na adesão, proliferação, migração e viabilidade celular, e seu potencial como suporte em engenharia de tecidos.

1.3 Objetivos específicos

Para atingir este objetivo, este trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Caracterização das membranas de celulose bacteriana comercial e produzida em laboratório;
- Avaliação do comportamento da linhagem celular L929 em suporte de celulose bacteriana comercial e produzida em laboratório através da utilização de métodos de análise do comportamento celular em testes de adesão, proliferação, viabilidade e migração celulares;
- Avaliar parâmetros biológicos descritos e correlacionar com propriedades físico-químicas da membrana.
- Quantificação; via modelamento matemático, dos parâmetros intrínsecos do sistema célula-membrana, tais como a velocidade específica de crescimento.

1.4 Introdução

A engenharia de tecidos envolve o desenvolvimento de novos materiais ou dispositivos capazes de interações específicas com os tecidos biológicos (Croce *et al.*, 2004), buscando a utilização de materiais biocompatíveis que devem servir como suporte e arquitetura para o crescimento de células *in vitro*, organizando e desenvolvendo o tecido que posteriormente será implantado no paciente.

A expansão das pesquisas na engenharia de tecidos tem acentuado a busca de novas classes de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis com bioatividade específica e controlável (Madhally e Matthew, 1999), para serem usados como suportes para culturas celulares (*scaffolds*) (Nehrer *et al.*, 1997), na tentativa de reconstruir tecidos *in vitro*.

Nos últimos anos, uma grande variedade de biomateriais vem sendo desenvolvida com diferentes propriedades físico-químicas e mecânicas, dependendo da aplicação biomédica prevista, incluindo regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos, novos enxertos vasculares, ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (Czaja *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2004).

O sucesso de um suporte a ser utilizado em engenharia de tecidos depende, em parte, da adesão e crescimento das células de interesse na sua superfície. A superfície química do material pode definir a resposta celular ao material e, desta forma, afetar a adesão, proliferação, migração e função das células (Boyan *et al.*, 1996; Dee *et al.*, 1998; Lauffenburger e Horwitz, 1996).

A interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetividade de implantes médicos (Craighead *et al.*, 2001), podendo definir o seu grau de rejeição. O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos a nível celular durante a adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (Kumari *et al.*, 2002).

Os desafios da engenharia de tecidos envolvem abordagens interdisciplinares e tecnologias que vão da biologia à engenharia. Muitos problemas ainda estão envolvidos

na eficácia dos métodos de engenharia de tecidos como as fontes celulares, construção dos suportes (*scaffolds*), semeadura das células, ambiente de cultura, análise da produção de matriz extracelular, propriedades mecânicas da construção célula-suporte e modelos *in vivo* apropriados (Ikada, 2006).

Engenharia de tecidos é uma tecnologia emergente com aplicações clínicas encorajadoras. As implicações para o tratamento dos pacientes e impactos econômicos são grandes (Stock e Vacanti, 2001). O propósito das pesquisas nesta área é estabelecer uma nova tecnologia clínica que tornará possível tratamentos médicos para doenças que têm sido difíceis de curar pelos métodos atualmente existentes (Ikada, 2006).

Avanços recentes no campo de biomateriais e suas aplicações médicas indicam a importância e o potencial de vários polissacarídeos de origem microbiológica no desenvolvimento de novas classes de materiais biomédicos (Czaja *et al.*, 2006). Dentre estes materiais encontra-se a celulose bacteriana. A celulose bacteriana possui uma nanoestrutura fibrilar única, que determina propriedades físicas e mecânicas características, que lhe conferem papel bastante promissor na medicina moderna e nas pesquisas biomédicas (Czaja *et al.*, 2007). Algumas questões a respeito deste biomaterial necessitam maior investigação. Ainda não há indicações claras do seu mecanismo de ação, mas acredita-se que seja promovido pela sua nanoestrutura característica, que proporciona condições favoráveis para a cura de feridas e regeneração tecidual (Hoenich, 2006). Desta forma, novos estudos *in vitro* e *in vivo* se fazem necessários, pois poderão prover o entendimento de sua interação com os tecidos biológicos.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos surgiu há aproximadamente três décadas como uma abordagem alternativa para a reconstrução de tecidos e órgãos que são severamente danificados e perdidos por doenças como o câncer, anomalias congênitas ou traumas e onde os tratamentos médicos convencionais não são mais aplicáveis (Ikada, 2006).

No final da década de 80, a engenharia de tecidos começou a ser ministrada em centros de ensino com o objetivo de avançar nos conhecimentos e pesquisas no tratamento de doenças utilizando abordagens celulares (Palsson e Bhatia, 2004).

Durante a década de 1990, a engenharia de tecidos progrediu rapidamente com o desenvolvimento de alguns substitutos biológicos de tecidos. Produtos biomédicos como peles artificiais com células viáveis e não-viáveis e condrócitos autólogos cultivados entraram prontamente no mercado (Chapekar, 2000).

A engenharia de tecidos, uma especialidade da engenharia biomédica, é definida por Palsson e Bhatia como a “Aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos para restaurar, manter ou melhorar a função tecidual” (Palsson e Bhatia, 2004).

O conceito de engenharia de tecidos foi ilustrado por Stock e Vacanti (Stock e Vacanti, 2001), e é apresentado na Figura 1.

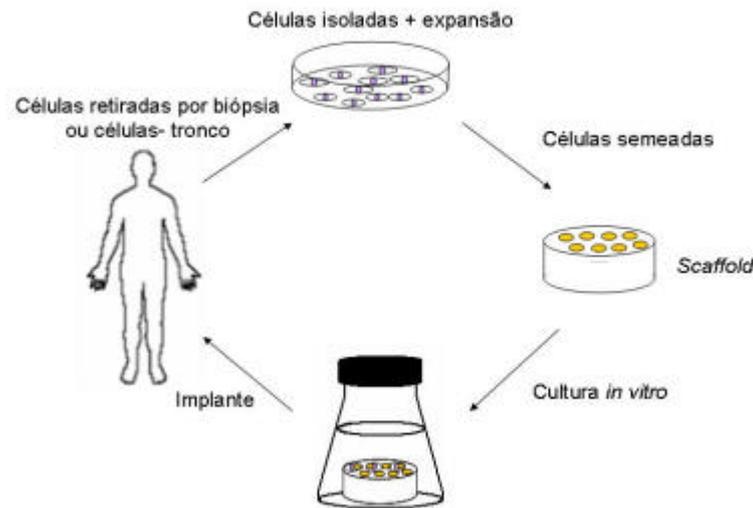


Figura 1. Conceito de Engenharia de Tecidos (adaptada de Stock e Vacanti, 2001).

Para regenerar novos tecidos, a engenharia biomédica utiliza três ferramentas: células, suportes e fatores de crescimento. As células sintetizam matriz extracelular para o novo tecido, o suporte deve prover o ambiente/suporte apropriado para as células crescerem e executarem suas funções, e os fatores de crescimento devem facilitar e promover a regeneração do novo tecido pelas células (Ikada, 2006).

O desenvolvimento de biomateriais e a utilização de suportes são partes cruciais da engenharia de tecidos, pois os suportes devem prover a estrutura e forma para o novo tecido, e são responsáveis pela organização do conjunto celular semeado, proporcionando o desenvolvimento do tecido ou órgão desejado que posteriormente será implantado (Stock e Vacanti, 2001).

Barbanti e colaboradores (Barbanti *et al.*, 2005) relacionam as principais etapas a serem seguidas para a obtenção de produtos na engenharia de tecidos, que são: (1) seleção e processamento do suporte; (2) inoculação da população celular sobre o suporte; (3) crescimento do tecido prematuro e crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico; (4) re-implante cirúrgico e, (5) período de assimilação do produto; como esquematizado na Figura 2.

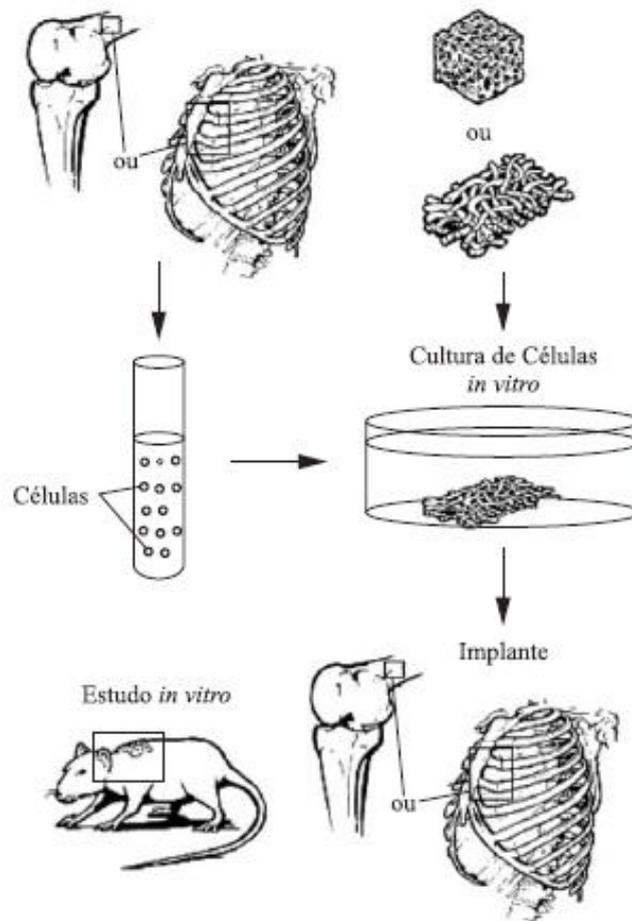


Figura 2. Técnica da engenharia de tecidos (retirado de Barbanti *et al*, 2005), apresentando as principais etapas da reposição tecidual. As células são retiradas do paciente, expandidas *in vitro*, cultivadas sob um suporte biopolimérico e após este procedimento, o tecido gerado é implantado no paciente.

Os produtos médicos de engenharia de tecidos (PMETs) tipicamente assumem uma das seguintes formas (Palsson e Bhatia, 2004):

- produtos híbridos de componentes biológicos (por exemplo, células) com ou sem componentes não biológicos (por exemplo, construções poliméricas);
- produtos que induzem uma resposta tecidual específica (por exemplo, regeneração);
- células biológicas significativamente manipuladas *in vitro* (por exemplo, geneticamente modificadas).

Uma característica distinta da engenharia de tecidos é a regeneração de tecidos e órgãos dos próprios pacientes, com boa biocompatibilidade e biofuncionalidade, sem que ocorram problemas com rejeições imunes severas (Ikada, 2006). Para isso, os materiais dos dispositivos de engenharia de tecidos devem prover as necessidades nutricionais e biológicas para a população específica das células envolvidas na formação do tecido (Stock e Vacanti, 2001), e devem seguir certos critérios para torná-los aptos a aplicações em seres vivos.

O material utilizado em implantes não pode ser rejeitado e não pode causar uma resposta inflamatória, devendo ser, portanto, **biocompatível**. Além disso, deve promover a cura e a regeneração tecidual; e, quando necessário, desaparecer depois de servir ao seu propósito, significando que o mesmo deve ser **biodegradável** (Chen e Wu, 2005).

O estudo das interações entre células e suporte na engenharia de tecidos é de grande importância para a determinação das propriedades biológicas dos implantes. A diversidade de respostas celulares a diferentes materiais evidencia a capacidade das células de discriminar quimicamente o suporte e de se adaptar a ele, e de aderir ou não à sua superfície (Anselme, 2000). Este evento é importante, pois a adesão das células ao suporte poderá influenciar em eventos celulares posteriores à adesão como a proliferação, viabilidade e migração celular.

2.2 Suportes para cultura celular (*Scaffolds*)

A função do *scaffold* é proporcionar tanto uma superfície para o crescimento celular quanto suporte mecânico e estrutural do tecido original enquanto o novo tecido é formado (Barbanti *et al.*, 2005). Na regeneração tecidual, este suporte proverá o ambiente necessário para a diferenciação celular e definirá a forma final do tecido regenerado (Hokugo *et al.*, 2006). Estas estruturas provêm um suporte biomecânico inicial para o tecido implantado até que as células produzam a matriz extracelular adequada. Durante a formação, deposição e organização da nova matriz, o ideal é que o *scaffold* degrade e seja metabolizado, deixando que o órgão vital ou tecido seja reestabelecido, mantenha ou melhore sua função tecidual (Stock e Vacanti, 2001).

A Figura 3 apresenta exemplos de *scaffolds* fabricados através de técnicas de engenharia de tecidos.

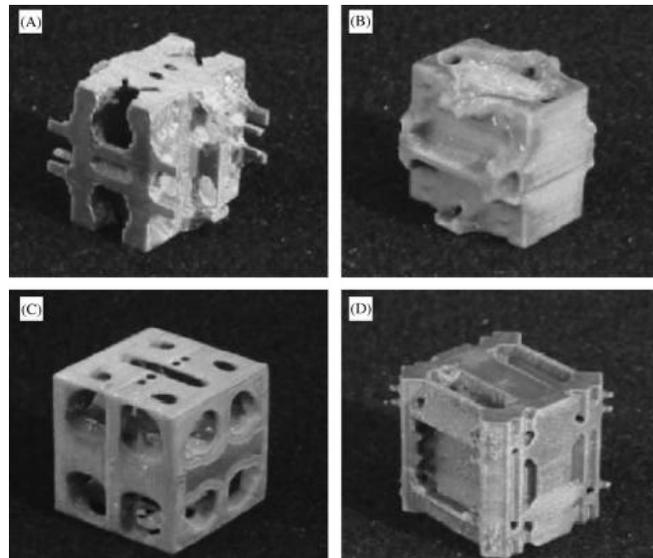


Figura 3. Exemplos de *scaffolds* de fibras de seda, com diferentes estruturas e porosidades, retirado de (Karageorgiou e Kaplan, 2005)).

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* como a resistência à tração, flexão e compressão, ductilidade (propriedade de suportar a deformação sem romper ou fraturar) e módulo de Young (razão entre tensão e deformação no regime elástico) são determinadas tanto pelas propriedades do material quanto pela estrutura do mesmo (macro, micro e nanoestrutura). A combinação das propriedades mecânicas do *scaffold* com o ambiente do enxerto é de crucial importância para que a progressão da recuperação tecidual não seja limitada por falhas mecânicas do *scaffold*, e para que haja a promoção da regeneração tecidual (Muschler *et al.*, 2004).

O suporte dado pelos biomateriais, através dos *scaffolds*, pode facilitar a restauração da estrutura e função de tecidos danificados, tanto em terapias baseadas em células, como aquelas que comportam células transplantadas ou matrizes que induzem a morfogênese em tecidos bioengenheirados construídos *ex vivo*, quanto em terapias sem células, como aquelas onde há materiais indutores de migração, crescimento e diferenciação das células em tecidos sadios *in situ* (Lutolf e Hubbell, 2005). Estes

materiais devem prover um suporte tridimensional provisório para interagir biomolecularmente com as células para controlar suas funções, guiando especialmente os processos multicelulares complexos de formação e regeneração tecidual (Lutolf e Hubbell, 2005). É importante salientar que a estrutura química do material e o seu processamento determinam as propriedades funcionais e a interação das células com o *scaffold* (Hollister, 2005). Além disso, estas estruturas biopoliméricas podem ser projetadas de duas formas: não porosos ou densos, de maneira a proteger as células implantadas do sistema imunológico, ou porosos, de forma a permitir a incorporação de novas células no corpo (Williams *et al.*, 1999).

O sucesso de um *scaffold* depende, em parte, da adesão e crescimento das células de interesse na sua superfície. A superfície química do material pode definir a resposta celular ao material e, de certa forma, afetar a adesão celular, proliferação, migração e função das células (Boyan *et al.*, 1996; Dee *et al.*, 1998; Lauffenburger e Horwitz, 1996). Não é apenas necessária a biocompatibilidade ou biodegradabilidade do arcabouço, mas também é essencial que a sua superfície possibilite a adesão celular e o subsequente crescimento tecidual. O ideal é que seja capaz de se ajustar as propriedades de superfície para atender à aplicação desejada, geralmente sem alterar outras propriedades deste *scaffold*, como sua resistência mecânica ou suas propriedades térmicas.

Para que o *scaffold* crie um ambiente apropriado, através do qual o novo tecido será formado (Muschler *et al.*, 2004), a química destas estruturas deve incluir interações específicas com os componentes de matriz extracelular como, fatores de crescimento e receptores celulares de superfície (Madhally e Matthew, 1999). Modificações úteis de superfície incluem mudanças no grupo químico funcional, carga de superfície, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e molhabilidade (Williams *et al.*, 1999). Desta forma, as características de superfície irão determinar o comportamento celular (Anselme, 2000) e definirão o grau de sucesso do implante.

Atualmente, a variedade de biomateriais disponíveis para uso na engenharia de tecidos, como substrato para culturas celulares ou arcabouços tridimensionais temporários com propriedades específicas, ainda é limitada (Williams *et al.*, 1999). Entretanto, progressos recentes têm sido relatados no campo de materiais biomédicos, que utilizam tanto polímeros naturais quanto sintéticos e que podem ser utilizados em

diversas aplicações, incluindo curativos, sistemas de liberação de fármacos, enxertos vasculares ou *scaffolds* para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (Czaja et al., 2007).

A biocompatibilidade destes biomateriais está relacionada com o comportamento das células em contato com eles e particularmente à adesão celular à sua superfície (Anselme, 2000). Para servir ao seu propósito com maior eficiência e maior biocompatibilidade, os biomateriais e biopolímeros podem sofrer modificações e serem incrementados com compostos que promovam a regeneração tecidual (Czaja et al., 2007).

As características de superfície dos biomateriais irão determinar quais moléculas biológicas serão adsorvidas. De acordo com as biomoléculas adsorvidas no biomaterial e sua orientação na superfície, haverá um comportamento celular característico, com conseqüências diretas na adesão, proliferação e diferenciação das células, sendo que estes eventos dependem de diversos fatores químicos e biológicos para ocorrer (Boyan et al., 1996). Além disso, deve-se levar em conta que as células usam a morfologia do suporte para sua orientação e migração (Boyan et al., 1996).

O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos em níveis celulares, durante a interação das células dependentes de ancoragem, que só proliferam após a adesão ao substrato, podem ajudar no desenvolvimento de novos biomateriais (Kumari et al., 2002; Watanabe et al., 1993).

Muitos polissacarídeos de origem microbiológica possuem propriedades físicas e biológicas interessantes para a engenharia de tecidos, e podem ser utilizados em várias aplicações em *scaffolds* como, por exemplo, o ácido hialurônico, dextrano, alginato e a celulose bacteriana (Czaja et al., 2007).

2.3. Celulose Bacteriana

Diversos biopolímeros têm sido investigados para aplicações como *scaffolds*, dentre os quais destaca-se a celulose bacteriana (Svensson et al., 2005). A celulose é um homopolímero linear de glicose $(C_6H_{10}O_5)_n$, com n variando de 500 a 5000, e é o material polimérico mais difundido na natureza (Muller et al., 2006). É insolúvel em

água e é degradado na natureza por enzimas (Martson *et al.*, 1999). A Figura 4 apresenta a estrutura química da celulose bacteriana.

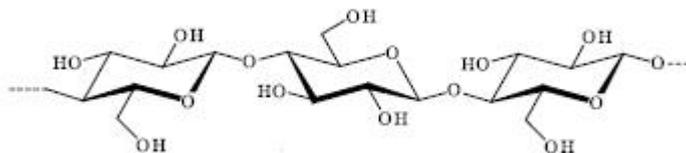


Figura 4. Estrutura química da celulose bacteriana (retirada de Klemm *et al.*, 2001).

A celulose bacteriana é um polissacarídeo excretado extracelularmente por diversas bactérias, entre elas a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*, em longas nanofibras não agregadas (Brown *et al.*, 1976), como pode ser visto na Figura 5. Esta bactéria constrói uma película de celulose bacteriana, entre o meio de cultura e a superfície gasosa, que tem em um lado uma superfície densa, e uma camada gelatinosa do lado oposto, que está em contato com o líquido (Backdahl *et al.*, 2006).

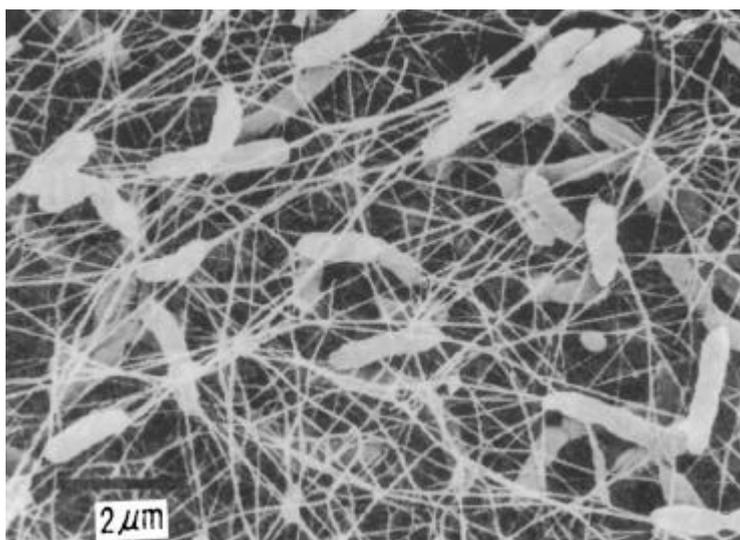


Figura 5. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) da rede de celulose bacteriana, mostrando as bactérias excretando as nanofibras celulósicas (retirada de Iguchi *et al.*, 2000).

A celulose bacteriana, diferentemente da celulose das plantas, não contém lignina, e também não contém componentes de origem animal e nenhuma espécie de proteína estranha e, portanto, não causa reações alérgicas (Sanchavanakit *et al.*, 2006). É um material altamente hidrofílico e tem a possibilidade de ser moldada em estruturas tridimensionais durante a síntese (Helenius *et al.*, 2006).

Segundo Svensson e colaboradores, a celulose bacteriana tem potencial para ser utilizada como substrato na engenharia de tecidos, devido às suas propriedades que incluem alta capacidade de retenção de água (hidrofilicidade), alta cristalinidade, uma rede de nanofibras, e alta resistência à tensão (Naritomi *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1991; Svensson *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 1998).

Essa estrutura nanofibrilar pode vir a ser uma matriz viável para auxiliar a cura de lesões dérmicas (Czaja *et al.*, 2007) e vem sendo desenvolvida e utilizada em diversas aplicações médicas como: substitutos temporários de pele no tratamento de lesões, queimaduras, úlceras, enxertos, como curativo de ferimentos e auxiliar em abrasões dérmicas (Fontana *et al.*, 1990; Sanchavanakit *et al.*, 2006). Um substituto dérmico ideal, por exemplo, deve ser capaz de funcionar como um guia para as células na reparação de áreas teciduais e como um *scaffold* para fibroblastos para sintetizar componentes de matriz extracelular (Croce *et al.*, 2004).

A celulose bacteriana é um material promissor também na produção de *scaffolds* de tecidos cartilagosos visto que possui alta resistência no estado úmido e moldabilidade *in situ*, biocompatibilidade, relativa simplicidade, e baixo custo de produção (Svensson *et al.*, 2005). A Figura 6, adaptada de (Klemm *et al.*, 2001) e (Czaja *et al.*, 2006) apresenta algumas aplicações médicas da celulose bacteriana.

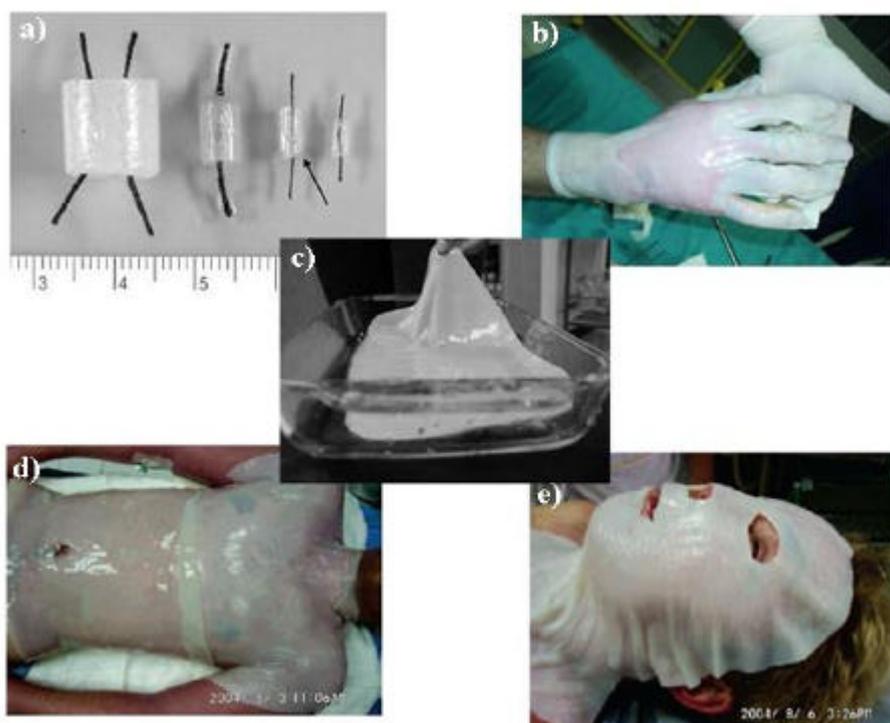


Figura 6. Algumas aplicações médicas da celulose bacteriana. Adaptada de (Klemm *et al.*, 2001) e (Czaja *et al.*, 2006), a) tubos de celulose bacteriana para implantes em vasos sanguíneos, b) d) e e) Celulose bacteriana aplicada em queimaduras e c) membrana de celulose bacteriana.

A degradabilidade da celulose bacteriana (CB) não está completamente elucidada nem *in vitro*, nem *in vivo* (Backdahl *et al.*, 2006). Mas, a degradação da celulose em tecidos animais e humanos é considerada limitada, em virtude da ausência de hidrolases que atacam a ligação $\beta(1,4)$ da cadeia de celulose. As pontes de hidrogênio dos grupos hidroxila, que mantêm as cadeias da celulose juntas, fazem com que a celulose bacteriana tenha um alto grau de cristalinidade, baixa solubilidade, e degradação pobre *in vivo* (Helenius *et al.*, 2006).

Apesar da idéia de um material completamente degradável para ser utilizado na engenharia de tecidos ser interessante, as dificuldades enfrentadas com os materiais degradáveis, como a otimização e sincronia do tempo de degradação e as propriedades mecânicas, levam a acreditar que um material não degradável possa também ser

vantajoso em relação a *scaffolds* degradáveis (Backdahl *et al.*, 2006; Helenius *et al.*, 2006).

Helenius e colaboradores (Helenius *et al.*, 2006) em seu trabalho com a celulose bacteriana *in vivo* contribuíram para um maior conhecimento sobre este biomaterial e sua interação com células. Neste trabalho, pedaços de celulose bacteriana foram implantados subcutaneamente em modelos de ratos, e sua biocompatibilidade *in vivo* foi avaliada. Os implantes de celulose bacteriana não causaram reação de corpo estranho, não apresentaram formação de fibrose ou encapsulamento, e o tecido conectivo dos ratos apresentou-se muito bem integrado às estruturas de celulose bacteriana. Após semanas do implante, o processo de remodelamento prosseguiu e os fibroblastos estavam completamente integrados na estrutura celulósica e sintetizaram colágeno. Neste estudo foi mostrado que a densidade do material influencia na morfologia e na invasão das células e, quanto maior a densidade da CB, menor a migração celular. Foi observado que as diferentes morfologias dos núcleos dos fibroblastos dependem da direção das nanofibras celulósicas e que o novo tecido formado apresentou vascularização, sendo este dado relevante quando se trata de implantes na engenharia de tecidos, pois é necessário para a sobrevivência e integração das células e pode determinar o sucesso do implante.

Apesar dos avanços recentes, a celulose bacteriana ainda não é amplamente utilizada ou investigada para aplicações em engenharia de tecidos (Backdahl *et al.*, 2006). No começo dos anos 80, ocorreram as primeiras tentativas de comercialização em escala industrial da celulose bacteriana. Entretanto, são necessárias mais pesquisas interdisciplinares para fazer da celulose bacteriana um produto de sucesso e sua comercialização e maior utilização em produtos biomédicos. Testes *in vitro* devem ser realizados, com uma maior variedade de células de mamíferos cultivadas em membranas de celulose bacteriana, para verificar sua viabilidade e proliferação, e também há necessidade de um grande número de estudos clínicos para provar sua utilidade e funcionalidade (Czaja *et al.*, 2007).

2.4 Linhagem celular L929

A linhagem de fibroblastos L929 é citada como referência para testes de citotoxicidade em biopolímeros (Serrano *et al.*, 2004). L929 é um subclone da linhagem parental L, uma linhagem celular estabelecida por W. R. Earle no ano de 1940. Foi uma das primeiras linhagens celulares a serem estabelecidas em cultura contínua. A linhagem L é derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias (<http://www.nce.ufrj.br/bcrj/busca1.asp?bcrj=CR020>, acesso em 09/08/2007).

Os fibroblastos são as células predominantemente encontradas em tecidos conectivos perdidos ou danificados, e são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos (Pan *et al.*, 2006). Estas células são importantes na produção de muitos componentes essenciais do tecido conectivo, como os componentes de matriz extracelular e, no tecido fibroso, o colágeno (Baxter *et al.*, 2002; Rae, 1981 apud). O encapsulamento fibroso é causado pelas células tipo fibroblasto que aderem às suas vizinhas preferencialmente ao suporte, e pode prejudicar a efetividade dos implantes (Baxter *et al.*, 2002; Brunette e Chehroudi, 1999 apud)

Promover a adesão dos fibroblastos ao biomaterial pode ajudar na integração do tecido conectivo mole ao implante, adicionando vascularização à superfície do implante e diminuindo a chance de encapsulamento fibroso e infecção bacteriana (Richards, 1996). Para isso, tornam-se necessários estudos de comportamento celular em biomateriais que podem colaborar para o desenvolvimento de implantes produzidos através de técnicas de engenharia de tecidos mais efetivos (Verrier *et al.*, 1996).

Deve-se levar em conta também, que modelos de cultura celular estão se tornando prevalentes na investigação de respostas de tecidos a materiais de implantes (Verrier *et al.*, 1996). O uso de métodos *in vitro* pode reduzir a extensão de testes em animais e pode reduzir significativamente o tempo e o custo dos testes (Kumari *et al.*, 2002).

2.5 Dinâmica celular: adesão, proliferação e migração celular

Quando se trata de regeneração de órgãos e tecidos, torna-se fundamental o estudo do comportamento e diferenciação celular induzidos pela estrutura, composição e presença de elementos biológicos dos suportes, para otimizar os suportes e avançar em técnicas de cultivo celular, que possam permitir a reprodução dos tecidos e órgãos em toda sua complexidade (Barbanti *et al.*, 2005).

A anexação, a adesão e o alongamento das células dependentes de ancoragem pertencem à primeira fase de interação entre célula-suporte. A qualidade desta primeira etapa influenciará as respostas subseqüentes das células e tecidos, como na capacidade das células de se proliferarem e diferenciarem em contato com o implante (Anselme, 2000; Kumari *et al.*, 2002).

A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois fenômenos diferentes: (1) fase de anexação, que ocorre rapidamente, envolve eventos como ligações físico-químicas entre as células e o material por forças iônicas e forças de van der Waals; (2) fase de adesão, que ocorre posteriormente e envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto, que interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e conseqüentemente regulando a expressão gênica (Anselme, 2000). A adesão celular é mediada por diferentes tipos de proteínas receptoras transmembrana conectadas ao citoesqueleto celular (Baxter *et al.*, 2002). Os aspectos da dinâmica da adesão celular necessitam de regulação destes receptores de adesão celular, que se encontram na superfície da célula (Gumbiner, 1996). Este fenômeno é crucial para a união de células individuais em tecidos tridimensionais de animais. As células não se juntam simplesmente e formam tecidos, na verdade elas estão organizadas em padrões diversos e altamente distintos (Gumbiner, 1996).

A capacidade adesiva dos conjuntos de receptores de adesão ou dos processos citoesqueleto-dependentes como o espalhamento celular, são cruciais para uma boa adesão celular, controle do crescimento e mobilidade celulares. A morfogênese tecidual requer a cooperação entre o processo físico de adesão celular e os processos de sinalização mediados por proteínas que controlam a transferência da informação entre as células. Portanto, os sistemas de adesão celular podem ser reconhecidos como

mecanismos que ajudam na tradução da informação genética básica nos complexos padrões tridimensionais das células nos tecidos (Gumbiner, 1996).

Os mecanismos que controlam o estado da adesão com o substrato são aspectos importantes a considerar (Gumbiner, 1996). As características hidrofílicas e hidrofóbicas dos materiais são muito importantes nestas interações entre células e substrato (Anselme, 2000). Geralmente, as células aderem mais fortemente a superfícies de materiais mais hidrofílicos (Yang *et al.*, 2002). A proliferação e a viabilidade celulares são fenômenos que também dependem diretamente da adesão das células (dependentes de ancoragem) ao substrato (Kumari *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2006).

A migração celular está envolvida em diversos fenômenos biológicos. É parte fundamental na formação dos órgãos na embriogênese, e sua importância permanece no organismo adulto, tanto na fisiologia normal, quanto nas patologias. Por exemplo, a migração dos fibroblastos e células endoteliais vasculares é essencial para a cura de feridas (Lauffenburger e Horwitz, 1996).

A migração celular requer uma interação dinâmica entre a célula, seu suporte e seu citoesqueleto (Anselme, 2000). Sabe-se que o processo de adesão da célula ao suporte é de grande importância para a migração celular. Para que a célula se movimente, primeiramente ela deve aderir ao suporte para que sejam desencadeados os eventos que provocarão seu movimento, incluindo a contração dos filamentos que conectam os complexos de adesão célula-suporte com estruturas intracelulares (Lauffenburger e Horwitz, 1996).

Mudanças nas formas dos tecidos frequentemente envolvem migrações celulares extensivas. As células podem migrar individualmente ou como uma parte aderente do tecido, acompanhando mudanças morfogenéticas nos tecidos (Gumbiner, 1996). Para que a migração celular seja entendida como um processo integrado há a necessidade de pesquisas das propriedades físicas e químicas dos componentes celulares que trabalham juntos como um sistema dinâmico, incluindo sua termodinâmica, cinética e características mecânicas, pois a migração é um processo coordenado tanto espacialmente quanto temporalmente (Lauffenburger e Horwitz, 1996).

Na engenharia de tecidos, a migração celular se torna crucial quando se trata de colonização dos *scaffolds* (Lauffenburger e Horwitz, 1996). Lo e colaboradores (Lo *et al.*, 2000) mostraram em seus trabalhos que as células apresentam diferentes morfologias e taxas de motilidade de acordo com a rigidez, flexibilidade e deformação mecânicas do substrato.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

A metodologia experimental utilizada neste trabalho está esquematizada no fluxograma da Figura 7. Cada etapa apresentada será descrita detalhadamente nas seções subsequentes.

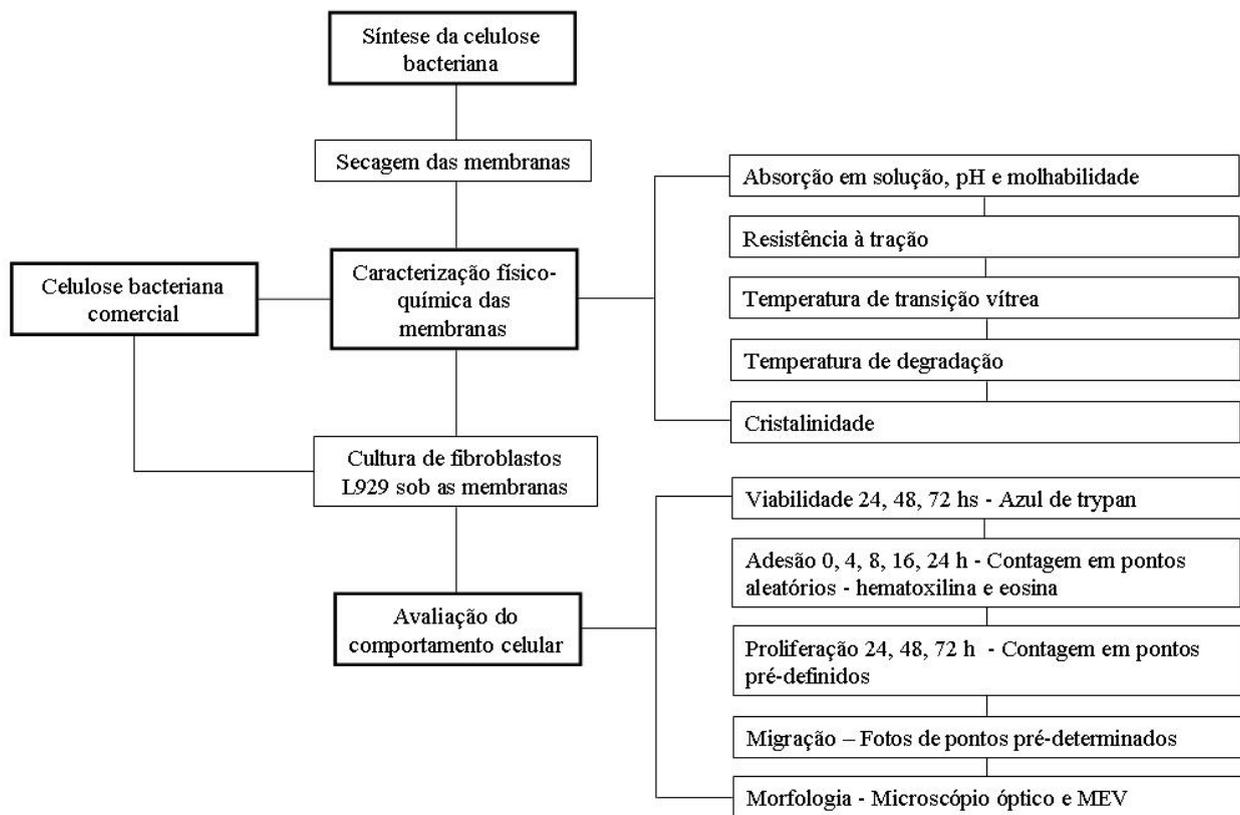


Figura 7. Fluxograma da metodologia experimental para o estudo da interação célula-celulose bacteriana.

3.1 Celulose bacteriana

3.1.1 Síntese

As membranas de celulose bacteriana (CB) foram sintetizadas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, (= *Acetobacter xylinum*), linhagem ATCC 23769, cultivadas com 150 ml de meio de cultura Hestrin & Schramm (Schramm *et al.*, 1957), a 30°C por 7 dias, sob condições estáticas, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos – LBBMM do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Para a purificação da celulose bacteriana formada na superfície líquida da cultura, as membranas foram removidas e tratadas com solução de 0,1M NaOH a 90°C durante 20 minutos para remover as células bacterianas e outras impurezas. Após este processo, as membranas foram lavadas com água destilada por uma semana e, subsequentemente, foram secas a 50°C por 24 horas.

Como material de comparação de resultados foram utilizadas membranas de celulose bacteriana comercialmente disponíveis (BIONEXT®, Bionext Produtos Biotecnológicos Ltda.). Para análise dos resultados utilizou-se as propriedades físico-químicas fornecidas pelo fabricante e constantes no relatório de caracterização confeccionado por Messaddeq e colaboradores (Messaddeq *et al.*, 2004).

3.1.2 Caracterização das membranas de celulose bacteriana

3.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados em equipamento Philips, XL-30, disponível no Laboratório de Materiais – LABMAT da UFSC, e foram utilizados para a caracterização microestrutural e morfológica das membranas de celulose bacteriana. Esta técnica é fundamentada na interação de um feixe eletrônico primário incidente (gerado por um canhão de elétrons) com a amostra. Cada análise depende do tipo de radiação detectada. Utilizam-se elétrons secundários para análises topográficas, retroespalhados para análises de composição química e raios

X para microanálises químicas e mapeamento de elementos. As amostras foram cortadas em filmes circulares de aproximadamente 25 mm², e foram dispostas sobre uma fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro, conforme procedimento padrão.

3.1.2.2 Microporosidade das Membranas

A microporosidade das membranas foi estimada através de análise de imagem. Essa microporosidade é atribuída aos poros (espaços vazios) entre as fibras, que possuem diâmetros equivalentes entre 50-700 nm.

3.1.2.3 Absorção de água e nutrientes

A absorção das membranas de CB comercial foi determinada pela absorção de água destilada e meio de cultura celular DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As medidas consistiram na imersão das membranas secas nas soluções por determinados períodos e medidas de massa, após remoção do excesso de solução na superfície. O experimento foi mantido até 24 horas. A porcentagem de ganho de massa das amostras foi calculada e graficada em função do tempo.

3.1.2.4 Cristalinidade

Ensaio de Difractometria de Raios-X (DRX, Philips, X'Pert), com radiação CuK α ($\lambda=1.45$ nm) foram utilizados para identificar as fases cristalinas da membrana de celulose. Membranas secas de CB foram colocadas sobre um substrato de alumínio e medidas em um intervalo de $2\theta = 5^\circ$ a 40° . O grau de cristalinidade (X_C) das membranas celulósicas foi estimado pelo difratograma, através da razão entre as áreas sobre os picos cristalinos (110) e (200) e a área total, de acordo com o método descrito por Watanabe e colaboradores (Watanabe *et al.*, 1998).

3.1.2.5 Análise térmica

As temperaturas características de transição vítrea (T_g) e degradação (T_d) das membranas de celulose foram determinadas através de análises térmicas. Os ensaios de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, Shimadzu, DSC 50) foram realizados em atmosfera de argônio, com fluxo dinâmico de 50 cm³/min. Primeiramente as amostras foram aquecidas a 150°C (com taxa e aquecimento de 20°C/min) para remoção da umidade absorvida. Após essa etapa as amostras foram rapidamente resfriadas com nitrogênio líquido (até -65°C) e novamente aquecidas a 300°C. Análise termogravimétrica (TGA, Shimadzu, TGA-50) foi realizada sob fluxo de argônio, na faixa de temperatura de 25°C (temp. ambiente) a 850°C com taxa de aquecimento de 20°C/min.

3.1.2.6 Resistência à tração

A resistência à tração da celulose bacteriana em temperatura ambiente foi medida para cinco amostras, com dimensões de 70 × 25 mm, usando uma máquina de ensaios universal (Instron Corp., Instron 4202). A velocidade de ensaio foi mantida constante, a 1 mm/min.

3.1.2.7 Molhabilidade

Para quantificar a molhabilidade das membranas de celulose bacteriana utilizou-se o método da gota séssil. Neste método, uma gota de água de aproximadamente 4 µl foi colocada suavemente sobre a superfície das membranas de celulose bacteriana (CB1, produzida no laboratório, e CB2, comercial) como mostra a ilustração da Figura 8, e foi registrada a imagem de 3 gotas diferentes dispostas sob as superfícies da membrana.

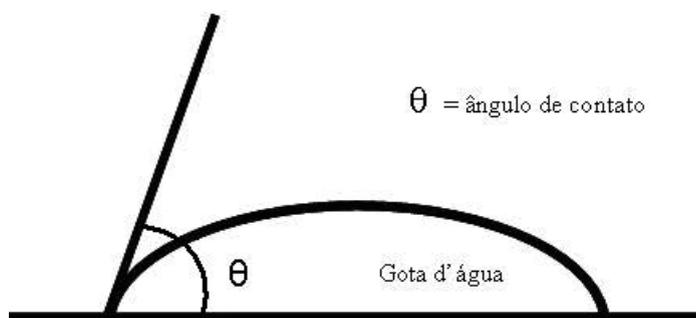


Figura 8. Representação da medida do ângulo de contato (θ), formado entre a gota e a superfície onde se encontra.

O ângulo de contato (θ) entre a gota e a superfície foi medido por análise de imagem através do software Image Tool (Image Tool, UTHSCSA for Windows, v.3.0).

3.1.2.8 pH

O pH das membranas CB1 e CB2 foi determinado pela medida do pH da solução, onde pedaços das membranas foram colocados. As soluções consistiam de água destilada e meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As medidas consistiram na imersão das membranas secas nas soluções por determinados períodos e medidas do pH da solução. O experimento foi mantido até 24 horas. O valor do pH das soluções foi graficado em função do tempo.

3.1.3 Preparação das membranas para cultura celular

As membranas foram cortadas em pedaços circulares (1,5 cm de diâmetro), esterilizadas sob radiação ultravioleta por 30 minutos e fixadas na placa de cultura, de poliestireno tratadas, com cilindros de vidro para que permanecessem no fundo dos poços da placa de cultura. Foram adicionados 500 μ l de meio de cultura nos 24 poços da placa de cultura por 30 minutos antes da semeadura das células. As células foram semeadas nos poços com e sem os filmes de celulose (controle), em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço em 1 ml de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM,

Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco, BRL), 2 mM L-glutamina, 4,5 g l⁻¹ de glicose, 1,5 g l⁻¹ de bicarbonato de sódio, 100 unidades·ml⁻¹ de penicilina e estreptomicina, em uma atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

A linhagem de fibroblastos L929 foi gentilmente cedida pela professora Tânia de Lima P. Pessatti, da Universidade do Vale do Itajaí. Todas as análises de contagem (adesão, proliferação e viabilidade) das culturas de fibroblasto L929, tanto nos filmes de celulose bacteriana, quanto nas superfícies controle, foram realizadas em microscópio óptico (Bioval, XDS-1B). Para os testes com a membrana CB1, a passagem das células utilizada foi a P19, e para a membrana CB2, a passagem foi a P8. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Para o controle foram utilizadas placas de cultura de poliestireno tratadas para cultura celular, que proporcionam maior adesão das células e esterilizadas por radiação gama; sendo que as células foram cultivadas diretamente sobre a placa, sem membranas.

3.2 Estudo *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.1 Adesão

A adesão dos fibroblastos nos filmes de celulose bacteriana foi analisada por coloração de hematoxilina e eosina (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), nos intervalos de 0, 4, 8, 16 e 24 horas. Para este ensaio foi adaptado o modelo de análise de adesão celular descrito por Min e colaboradores (Min *et al*, 2004).

As membranas com as células cultivadas, em cada intervalo, foram lavadas com 1 ml de PBS, fixadas com 100 µl de solução álcool:acetona (1:1 em volume) e, após a secagem, adicionou-se 50 µl de hematoxilina por 1 min. As membranas foram imersas

em 4 ml de água milliQ durante 2,5 min. Aspirou-se a água e foram adicionados 50 µl de eosina por um minuto. O procedimento de lavagem foi mais uma vez repetido para realizar a contagem. O mesmo procedimento foi feito com o controle. Depois de secas as membranas e o controle foram analisados sob microscópio óptico, e foram contados cinco pontos aleatórios com área de 0,41 mm² cada, na membrana.

3.2.2 Proliferação

A proliferação dos fibroblastos nos filmes de celulose bacteriana foi analisada por contagem de células em três pontos pré-definidos nas membranas e nos controles de poliestireno, sempre dos mesmos poços, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. O protocolo utilizado para análise da proliferação foi o mesmo dos ensaios de adesão, também modificado.

3.2.3 Viabilidade celular

Para o estudo de viabilidade celular, as células foram analisadas tanto nas membranas de celulose bacteriana quanto nos controles de poliestireno, durante diferentes tempos de cultura, 24, 48 e 72 h. A cada intervalo, o meio de cultura foi aspirado, e as células lavadas com 1 ml de PBS. Após lavagem, foram adicionados a cada amostra 200 µl de azul de trypan por 5 min, e o excedente foi aspirado para realizar a contagem das células viáveis. No tempo zero foram consideradas todas as 25000 células iniciais viáveis.

3.2.4 Morfologia celular

Para a avaliação da morfologia celular foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV, Philips, XL-30). A morfologia das células em cultura foi avaliada quantitativamente através de análise de imagem (Image Tool, UTHSCSA for Windows, v.3.0) de imagens binarizadas.

Para os estudos de MEV, as células fixas no substrato foram lavadas duas vezes com PBS, e fixadas com 100 µl de solução álcool:acetona (1:1) por 5 min. Depois de lavadas com PBS, a desidratação foi feita através de troca lenta de água usando uma série de soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 90%) por 15 min com desidratação final em etanol absoluto por 30 min, permitindo que as amostras secassem à temperatura ambiente e sob vácuo.

3.2.5 Migração celular

Neste trabalho foi adaptado o modelo de análise de migração celular descrito por Sanchavanakit e colaboradores (Sanchavanakit *et al.*, 2006).

As membranas foram cortadas em pedaços circulares (1,5 cm de diâmetro), e fixadas na placa de cultura com cilindros de vidro para que permanecessem no fundo dos poços da placa de cultura. Subsequentemente, barreiras de plástico foram dispostas no centro diametral dos poços dividindo-os em duas partes. A Figura 9 ilustra esquematicamente um poço da placa de cultura, com a barreira.

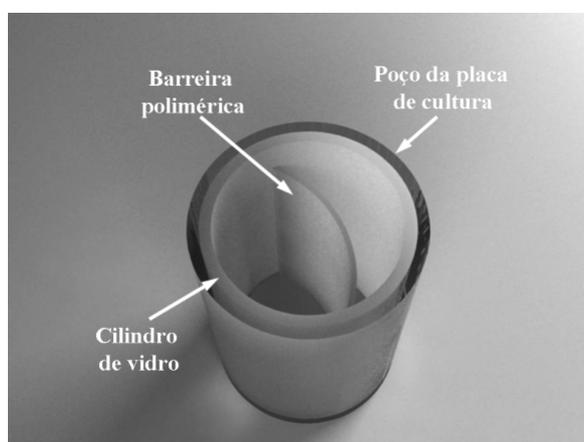


Figura 9. Aparato desenvolvido para analisar a migração celular. Representação de um poço da placa de cultura de 24 poços, com o cilindro de vidro e com a barreira polimérica.

As células foram plaqueadas em uma das metades de cada poço, em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço e incubadas a 37° C e 5% CO₂. Após 24 horas

de incubação, o meio foi aspirado e a barreira foi retirada para permitir o movimento das células. O meio de cultura foi então repostado (1 ml).

Para a análise da migração celular, fotografias de pontos pré-determinados foram registradas, em diferentes intervalos de cultura. Foi utilizado microscópio de contraste de fase com uma câmera digital SONY Cybershot 6.0Mp acoplada.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das membranas de celulose bacteriana

No estado hidratado o biofilme formado na superfície do meio de cultura da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* é um gel resistente, moldável, transparente e homogêneo, como mostra a Figura 10. Depois de seca, a espessura das membranas varia entre 150 μm e 200 μm .

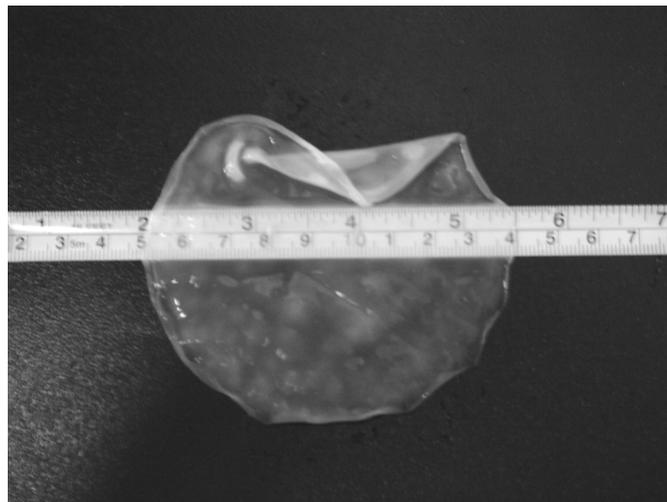


Figura 10. Fotografia de uma membrana de celulose bacteriana hidratada (gel).

Uma análise mais detalhada da microestrutura das membranas CB1 e CB2 por Microscopia Eletrônica de Varredura, representada na Figura 11, revelou que depois de seca a *zooglea* é composta de longas fibras. O filme consiste de uma matriz celulósica homogênea, densa e livre de defeitos aparentes, sendo formada por uma rede entrelaçada de longas nanofibras celulósicas com alta razão de aspecto e diâmetros menores do que 100 nm.

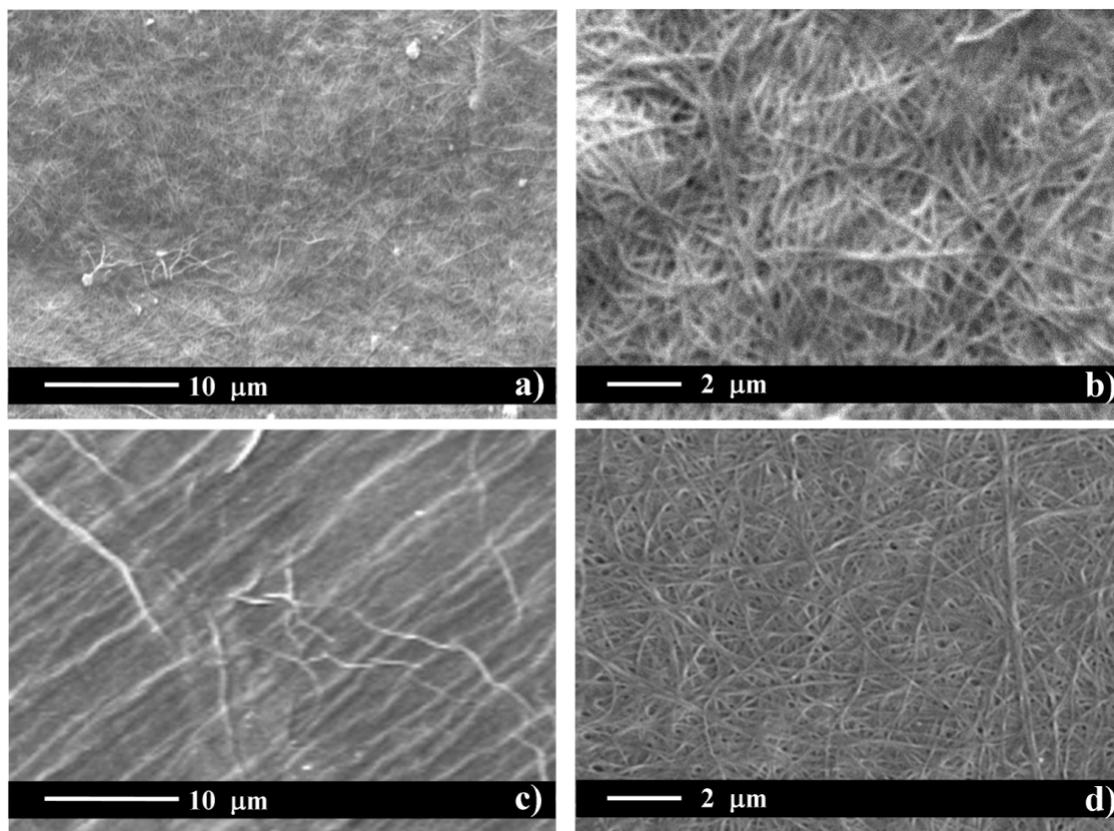


Figura 11. Micrografias (MEV) da superfície das membranas a) e b) CB1, e c) e d) CB2, mostrando a rede de nanofibras entrelaçadas das membranas e porosidade. Aumentos de 2000x a e c, e 8000x b e d.

A alta razão de aspecto, dada pela razão entre o comprimento e o diâmetro das fibras, pode afetar as propriedades mecânicas do filme, tais como elasticidade e resistência à tração, razão pela qual a morfologia fibrosa foi assunto de discussão na última década e ainda permanece (Helbert *et al.*, 1998; OSullivan, 1997). A biossíntese da celulose é caracterizada pelo crescimento unidirecional e cristalização, onde moléculas de glicose são agrupadas linearmente por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$. A união de cadeias glicosídicas forma microfibrilas orientadas por pontes de hidrogênio intramoleculares (Saxena *et al.*, 1994). A orientação preferencial do crescimento de cristais celulósicos durante a biossíntese foi anteriormente reportada por Koama e colaboradores (Koyama *et al.*, 1997). A celulose é cristalizada e excretada para fora dos organismos, particularmente na *Gluconacetobacter hansenii* que sintetiza as cadeias de

celulose introduzindo unidades de glicose nas extremidades do polímero. O mecanismo de crescimento durante a atividade bacteriana determina a morfologia da celulose final.

Porosidades na faixa entre 30-35% foram estimadas na superfície das membranas de celulose bacteriana. A porosidade, bem como o tamanho de poro pode variar dependendo do grau de interligação entre as microfibrilas, tornando a malha de fibras mais densa. O processo de secagem da celulose bacteriana também interfere na porosidade do material, sendo que quando secas em estufa, a porosidade e o tamanho dos poros das membranas diminuem consideravelmente.

As propriedades mecânicas dos biomateriais se tornam importantes na escolha de qual material utilizar na aplicação médica desejada. Diferentes tipos de tecidos exigem diferentes propriedades mecânicas do material para poderem ser regenerados ou substituídos, como na engenharia de tecidos de pele, cartilagem, óssea ou vascular.

A Figura 12 mostra o comportamento de absorção das membranas CB1 e CB2 imersas em água ou em meio DMEM. Os comportamentos de absorção foram similares dentro do desvio estatístico. Após uma hora, a massa atingiu o valor máximo (aproximadamente 200%), e permaneceu relativamente estável entre a segunda hora e 24 horas. Para a membrana CB2, o comportamento foi similar, exceto para a membrana CB1 imersa em DMEM, que apresentou um aumento substancial na absorção, atingindo 400% após 24 h.

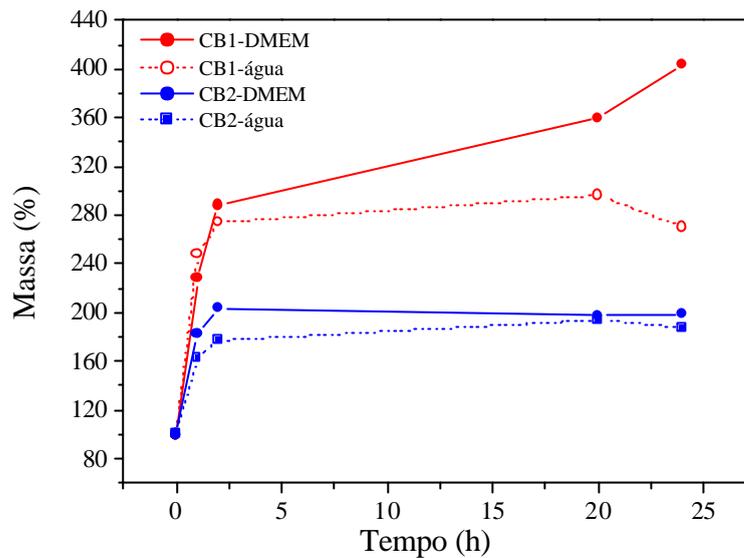


Figura 12. Comportamento de absorção das membranas CB1 e CB2 nas soluções de meio DMEM (10% SBF) e água destilada. A CB1 apresentou maior ganho de massa que a CB2, tanto na água quanto no meio de cultura DMEM.

A absorção ocorre por um efeito combinado da absorção/inchamento das fibras e perda das ligações friccionais entre as fibras, causando seu deslocamento. Esse deslocamento das fibras provoca uma expansão do volume, resultando em espaços livres para a absorção do líquido. A expansão máxima das fibras depende da capacidade de absorção das fibras no líquido, ou da habilidade do líquido de formar pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da celulose (Mantanis *et al.*, 1995).

Os valores de absorção das membranas foram maiores no meio de cultura do que na água. Isto pode ser um indicativo da adsorção de proteínas do meio pelas membranas, considerando que quando uma superfície é colocada em contato com um fluido biológico, o primeiro processo que ocorre é a absorção de água, e imediatamente após, a adsorção de proteínas (Boulmedais *et al.*, 2004).

A CB1 apresentou um ganho de massa maior do que a CB2 comercial, tanto no DMEM quanto na água. Este fenômeno pode ser um indicativo de uma maior adsorção de proteínas pela membrana CB1 no meio DMEM, sendo que estas proteínas podem interferir na adesão celular, proporcionando um substrato que promove melhor a adesão.

A Figura 13 mostra o difratograma de raios X da superfície da CB1. Três picos de difração podem ser observados, que foram identificados como os planos (1 $\bar{1}$ 0), (110) e (200) da membrana (Tokoh *et al.*, 1998). O grau de cristalinidade (X_C) estimado dessa membrana é de $56 \pm 5\%$. O grau de cristalinidade da membrana CB2, estimado através do difratograma fornecido pela análise do fabricante, é de $61 \pm 5\%$.

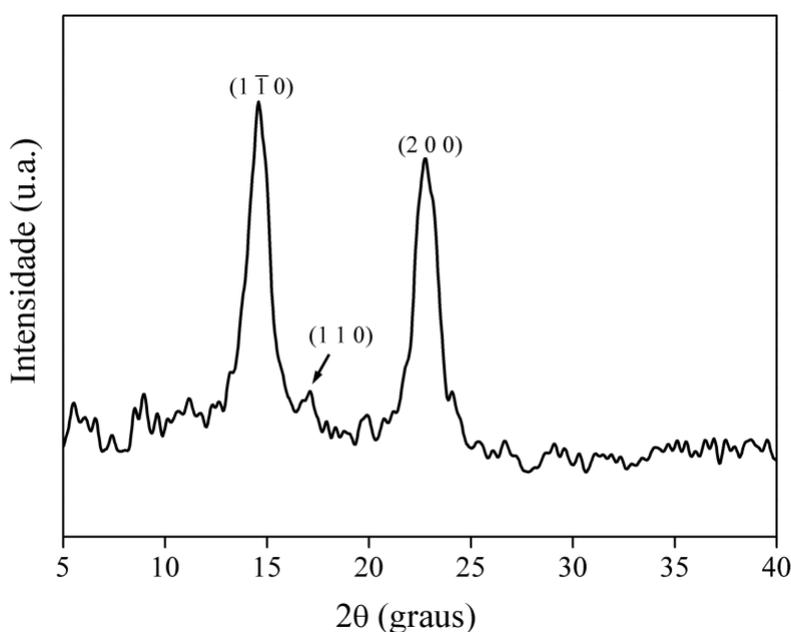


Figura 13. Difractometria de raios-X da membrana CB1.

O comportamento físico-químico de um polímero é fortemente influenciado pelo grau de cristalinidade da sua estrutura. Por exemplo, a cristalinidade da celulose influencia diretamente as propriedades de degradação, absorção e retenção de água (Schenzel *et al.*, 2005).

A Figura 14 mostra as análises térmicas obtidas da membrana CB1. O termograma de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é mostrado na Figura 14a. A temperatura de transição vítrea (T_g) de um material polimérico é a temperatura na qual ocorre uma mudança de um estado de rigidez vítrea para um estado viscoso (como na borracha). Essa transição é seguida de um aumento da capacidade térmica e uma endoterma de relaxação, caracterizada por uma transição em degrau, como mostrado em detalhes à direita da figura, onde a T_g está indicada pela seta em $35,5^\circ\text{C}$. A T_g de

macromoléculas cristalinas é muito difícil de ser detectada, devido às largas curvas de fluxo de calor, o que faz com que qualquer desvio da linha base se torne quase indistinguível. Esses resultados são similares aos relatados por George e colaboradores (George; Ramana; Sabapathy; Jagannath *et al.*, 2005), onde a T_g de membranas celulósicas tratadas quimicamente com NaOH apresenta-se deslocada para valores maiores ($\sim 40^\circ\text{C}$), comparados com membranas não tratadas ($\sim 14^\circ\text{C}$). Esse deslocamento pode ser atribuído a mudanças na mobilidade molecular das nanofibras celulósicas após tratamento. Além disso, a curva de fluxo de calor expandida evidenciou um pico endotérmico a $116,2^\circ\text{C}$, que pode ser atribuída a temperatura de fusão cristalina (T_m) do polímero. Em temperaturas elevadas ($>270^\circ\text{C}$), a curva de DSC mostrada na Figura 14a apresentou um aumento de fluxo de calor (fenômeno exotérmico), que é atribuído ao estágio inicial de degradação da celulose, como confirmado pela análise termogravimétrica (TGA). A Figura 14b mostra a curva termogravimétrica (TG), da membrana CB1 com sua respectiva derivada, da membrana CB1. A primeira etapa de perda de massa é atribuída à liberação de água (em torno de 100°C). Uma perda acentuada de 68% pode ser observada a aproximadamente 341°C , relacionada à degradação das cadeias celulósicas (T_d).

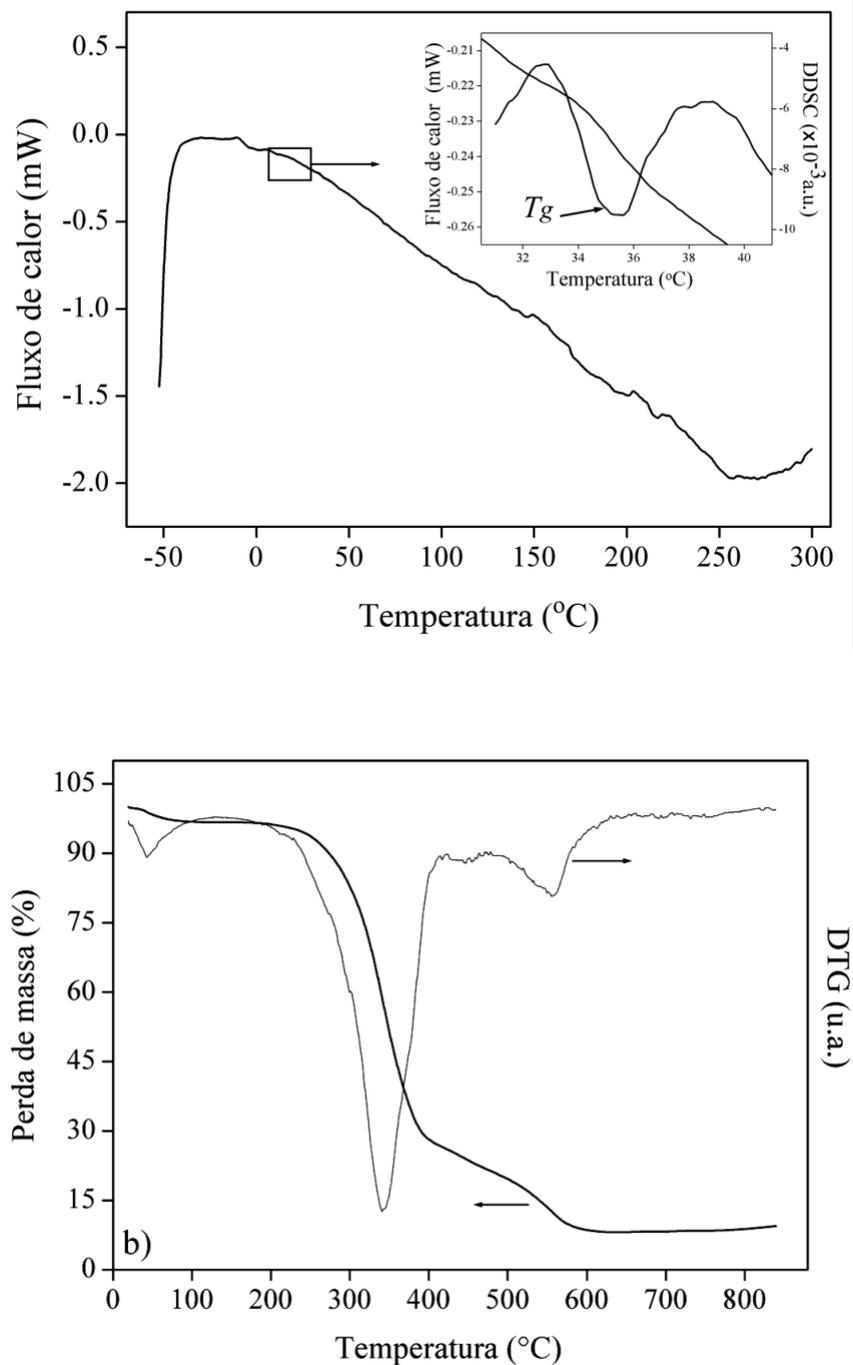


Figura 14. Análise térmica da membrana CB1; a) termograma de DSC. O detalhe mostra a faixa de temperatura entre 31°C e 41°C; b) curva TG, com a respectiva derivada.

Sob tensão, a membrana CB1 demonstrou uma baixa deformação elástica antes do rompimento, como pode ser observado no gráfico na Figura 15. A ruptura ocorreu após 3,4% de deformação. Esta membrana apresentou uma resistência à tração de 28

MPa. Resistência à tração das membranas de celulose bacteriana não tratadas apresentam valores geralmente maiores que 65 MPa (George; Ramana; Sabapathy; Jagannath *et al.*, 2005). A baixa resistência das membranas tratadas com NaOH pode ser atribuída a suas propriedades de absorção. Durante a absorção e inchamento das fibras de celulose, as junções intramoleculares entre as fibras se rompem, como resultado da tensão interna produzida pela absorção (Mantanis *et al.*, 1995). Devido à absorção, a ordenação entre as fibras é reduzida e isso pode contribuir para uma redução na resistência mecânica.

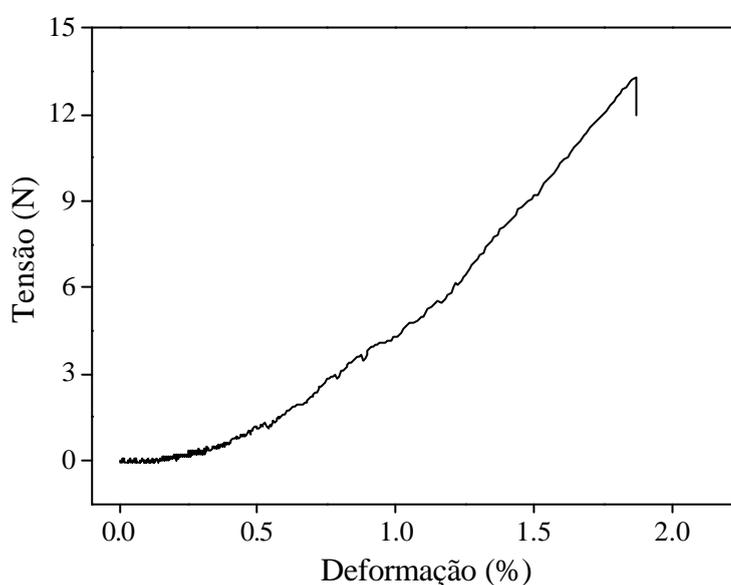


Figura 15. Curva típica de tensão-deformação da CB1 sob força de tração.

A Tabela I resume as propriedades chave das membranas CB1 obtidas neste trabalho em comparação com outros dados da literatura.

Tabela I: Propriedades da celulose bacteriana (T_g = temperatura de transição vítrea; T_d = temperatura de degradação).

Propriedade	CB (outros trabalhos)	Refs.	CB1
Resist. à tração	10 – 70 MPa	(1,2)	32±5 MPa
T_g	13°C – 49°C	(3)	35,5 °C
T_d	> 300°C	(3)	341 °C
Cristalinidade	40 – 70%	(4, 5, 6, 7)	56±5%

(1) (George; Ramana; Sabapathy; Jagannath *et al.*, 2005)

(2) (Nakagaito *et al.*, 2005)

(3) (George; Ramana; Sabapathy e Bawa, 2005)

(4) (OSullivan, 1997)

(5) (Tokoh *et al.*, 1998)

(6) (Schenzel *et al.*, 2005)

(7) (Watanabe *et al.*, 1998)

Outra característica das membranas pode ser dada pela medição do ângulo de molhabilidade. Este ângulo é formado por um líquido sobre uma superfície e é um método utilizado para determinar a hidrofobicidade dos materiais, permitindo avaliar a molhabilidade dessa superfície. Este parâmetro macroscópico revela o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de superfícies, e caracteriza também o nível microscópico da superfície em estudo, como a energia de superfície.

Os valores médios dos ângulos de contato das membranas CB1 e CB2 comercial foram 31,1° e 51,5° respectivamente. Considerando estes valores, a membrana CB1 apresentou-se mais hidrofílica em comparação com a CB2. As imagens obtidas dos ensaios estão apresentadas na Figura 16.

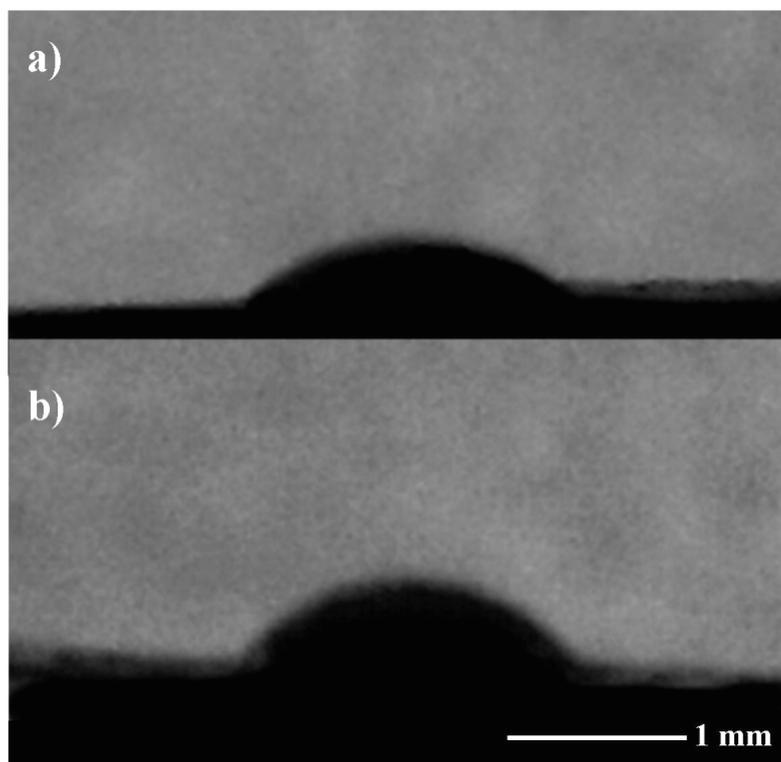


Figura 16. Imagem das gotas de água nas membranas para cálculo do ângulo de contato a) CB1 e b) CB2 comercial.

Os valores obtidos de molhabilidade corroboram com a porcentagem de absorção medida para as membranas CB1 e CB2 comercial, e podem ajudar a explicar o comportamento celular obtido nestas membranas, discutido mais a frente.

Apesar de o poliestireno ser reconhecidamente hidrofóbico, seu revestimento na placa (próprio para cultura e adesão celular) mostrou-se hidrofílico, razão pelo qual a adesão nos controles foi maior.

Os valores do pH das soluções das membranas CB1 e CB2 estão representados na Figura 17.

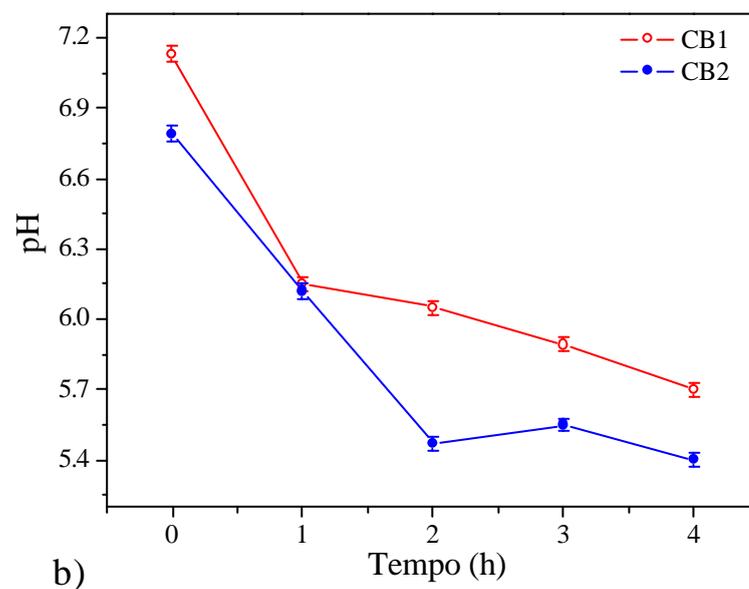
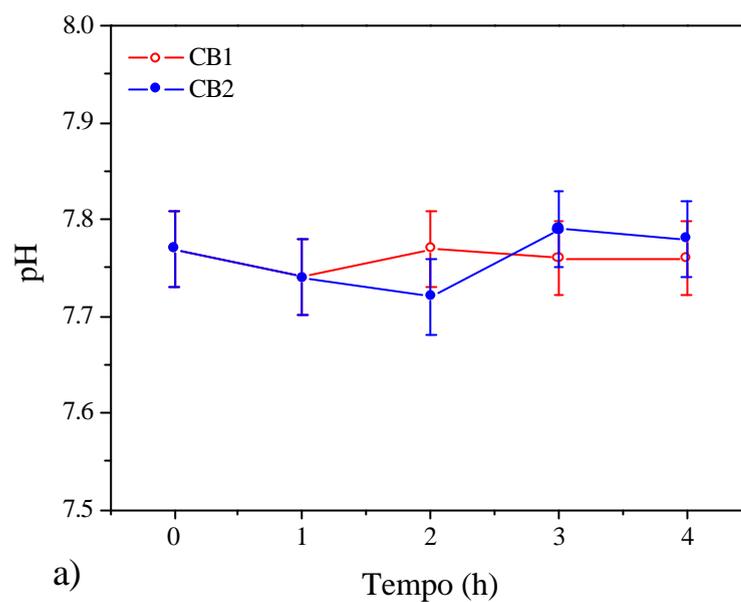


Figura 17. Valores medidos do pH da solução: a) membranas CB1 e CB2 comercial em meio DMEM suplementado com 10% SFB e b) CB1 e CB2 comercial em água destilada.

Os valores de pH obtidos para as membranas imersas no meio DMEM mantiveram-se em torno de 7,7, enquanto nas membranas imersas na água destilada os

valores de pH decresceram em função do tempo, variando de 7,2 à 5,4. A maior estabilidade dos valores de pH no meio de cultura pode ser causada pelo tampão adicionado ao meio de cultura que colabora para que o pH mantenha-se à 7,4 nas culturas celulares em estufa de CO₂. O pH pode interferir na adsorção de proteínas pelas membranas e, quando incorporadas, estas poderão interferir na adesão das células às superfícies (Boulmedais *et al.*, 2004).

4.2 Estudo *in vitro*

Após o cultivo observou-se que os padrões de distribuição celular entre as células nas membranas e no controle foram diferentes como pode ser observado nas imagens de microscopia óptica (Figura 18).

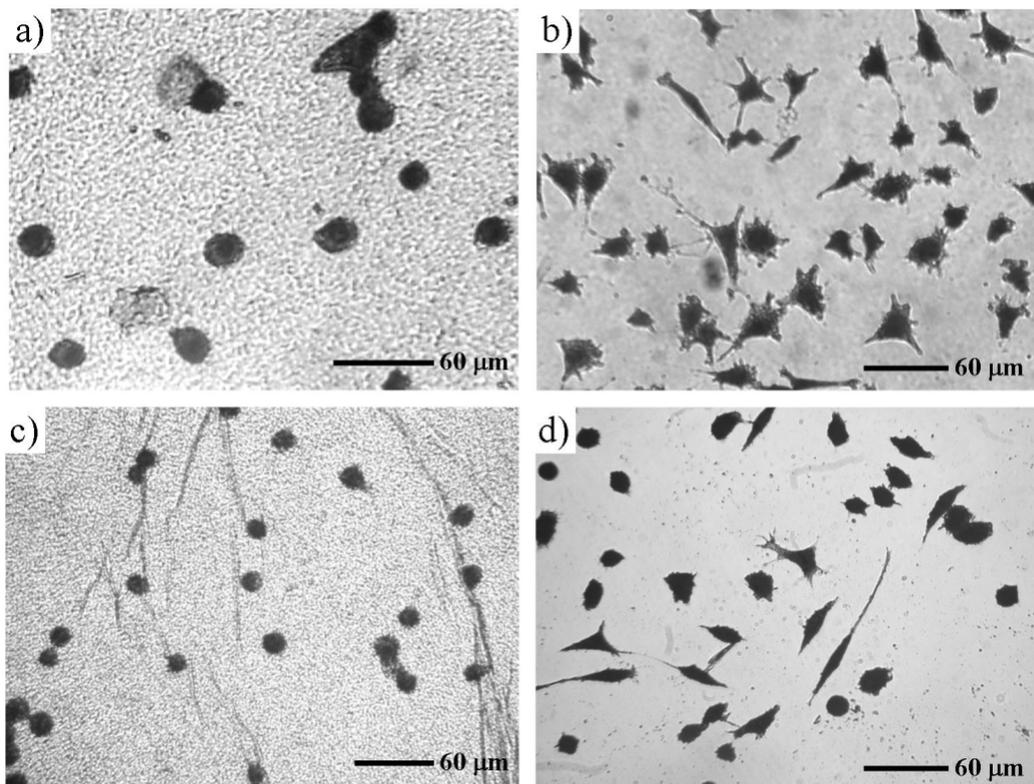


Figura 18. Microscopia óptica dos fibroblastos aderidos, após 24 h de cultura: a) membrana CB1, b) controle da CB1, c) membrana CB2, d) controle da CB2. Nos controles as células estão cultivadas diretamente sobre as placas de poliestireno.

As medidas de adesão foram realizadas em curtos períodos de cultura. Cho e colaboradores mostraram que os fibroblastos aderem nas superfícies dos substratos que são favoráveis à adesão, mostrando rápidas mudanças morfológicas que vão de formatos arredondados a formatos alongados depois de apenas 1 hora de cultivo (Cho *et al.*, 1996; Gotoh e Tamada, 2005). Considera-se que a fase de anexação da adesão celular ocorre rapidamente e envolve ligações físico-químicas entre as células e o material, incluindo forças iônicas (Kumari *et al.*, 2002).

Após 24 h as células nas membranas de celulose bacteriana mantiveram uma forma arredondada, e tenderam a se agrupar (Figuras 18a e 18c). Já nos controles as células apresentaram forma alongada, típica de fibroblastos, e atingiram confluência em 48 h. As células cultivadas nas CB, entretanto, não atingiram confluência no intervalo de cultura estudado.

Watanabe e colaboradores (Watanabe *et al.*, 1993) testaram a linhagem L929 em membranas de celulose bacteriana sem tratamento, sintetizadas por *Acetobacter aceti*, e relataram que, em seus testes iniciais, as células não proliferaram significativamente e apresentaram baixo crescimento, alongamento e baixa adesão, comparadas às células cultivadas em placas de Petri. Com algumas modificações de cargas elétricas na superfície, não foram observadas modificações morfológicas significativas das células nas membranas de celulose bacteriana e houve um aumento significativo no crescimento celular.

A Figura 19a mostra as curvas de adesão dos fibroblastos nas membranas CB1 e seu controle em 24 h. A adesão dos fibroblastos foi maior no controle, atingindo um valor de 340% após 16 h, enquanto na membrana, o valor máximo atingido foi de 60% após 24 h. O número relativo de células foi definido como o número total de células contadas em relação ao número inicial.

A Figura 19b mostra as curvas de adesão dos fibroblastos nas membranas CB2 e seu controle em 24 h. A adesão dos fibroblastos foi maior no controle, atingindo um valor de 320% após 16 h, enquanto na membrana o valor máximo atingido foi de 60% após 24h.

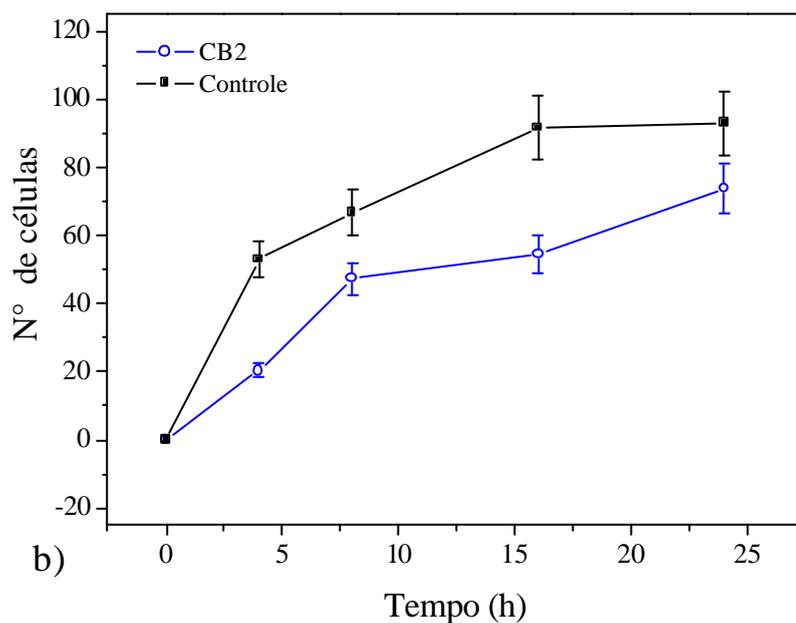
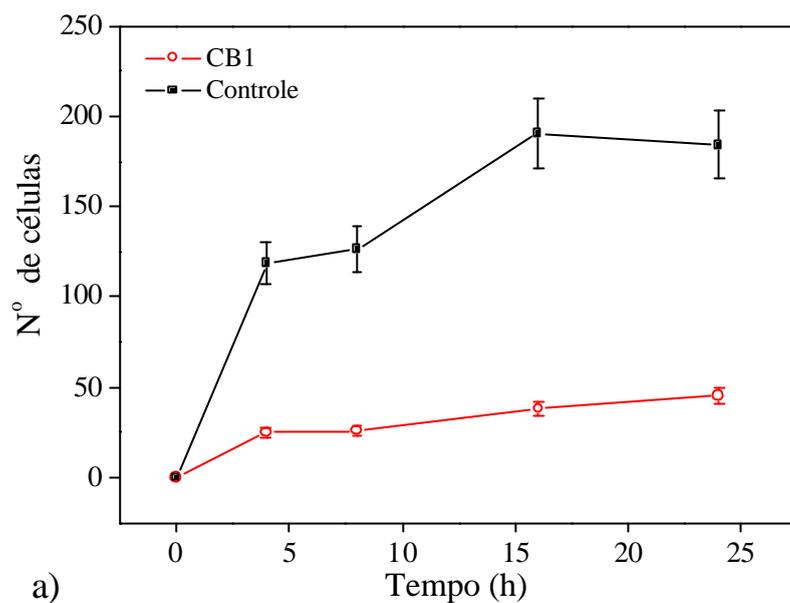


Figura 19. Contagem de células aderidas nas membranas a) CB1 e b) CB2 comercial em relação a seus controles e em função do tempo de cultura.

Esta quantidade menor de células aderidas nas membranas pode ser interessante. Estudos recentes indicam que tanto suportes adesivos e não adesivos são necessários

para planejar materiais para regeneração tecidual. Usando suportes com diferentes características adesivas, os *scaffolds* para cultura tecidual podem conter áreas adesivas e regiões não adesivas e modular formatos celulares e funções teciduais em culturas celulares organizadas (Gotoh e Tamada, 2005).

Na comparação entre o número de células aderidas nas membranas CB1 e CB2, a primeira membrana mostrou-se um substrato mais aderente do que a segunda, pois apresentou um maior número de células aderidas durante as 24 horas do experimento. Entretanto, as curvas de adesão seguem o mesmo comportamento, como pode ser observado na Figura 20. Os controles do teste com a CB1 também apresentaram maior número de células aderidas do que o controle da CB2.

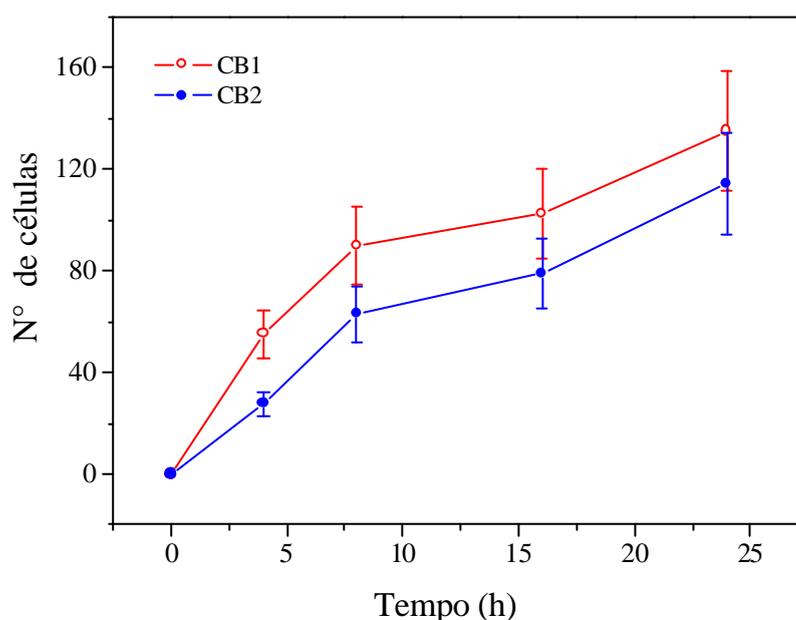


Figura 20. Contagem de células aderidas na membrana CB1 e CB2 comercial

Quanto à morfologia celular, ela também é influenciada pela confluência ou densidade de células (Palsson e Bhatia, 2004). Embora a morfologia celular seja uma medida qualitativa e subjetiva, muitas informações quantitativas podem ser extraídas

através de análise de imagem. Um exemplo de informação quantitativa é o fator de forma.

O cálculo do fator de forma fornece informações sobre o espalhamento e adesão celular. A distribuição do fator de forma foi obtida através da análise de imagens, consideradas representativas, contendo, em média, 100 células. Foram realizadas 3 imagens para cada um dos casos (controle e membrana). O perfil das curvas de distribuição foi semelhante entre os casos. O método utilizado no software para a estimativa do fator de forma é uma relação entre o perímetro (P) do objeto, (número de pixels pretos na fronteira entre pixels pretos e brancos) e a área (A) contida nesse perímetro (número total de pixels pretos). O cálculo é realizado através da equação 1:

$$F = \frac{4pA}{P^2} \quad (1)$$

onde $0 \leq F \leq 1$.

A Figura 21 mostra a distribuição de fator de forma das células após 24 horas de adesão. Ambas as culturas na CB1, CB2 e controles apresentam distribuição bimodal para o fator de forma. As células do controle apresentaram uma distribuição bimodal e larga para fatores menores que 0,6, com a minoria de células com fatores próximos de 1 (Figura 21a). Neste caso, a maior parte das células encontra-se alongada (formatos que se distanciam do circular). As células aderidas nas membranas, no entanto, apresentaram uma distribuição mais estreita da maior fração de células em valores próximos de 1, o que indica formatos arredondados (Figuras 21b e 21c).

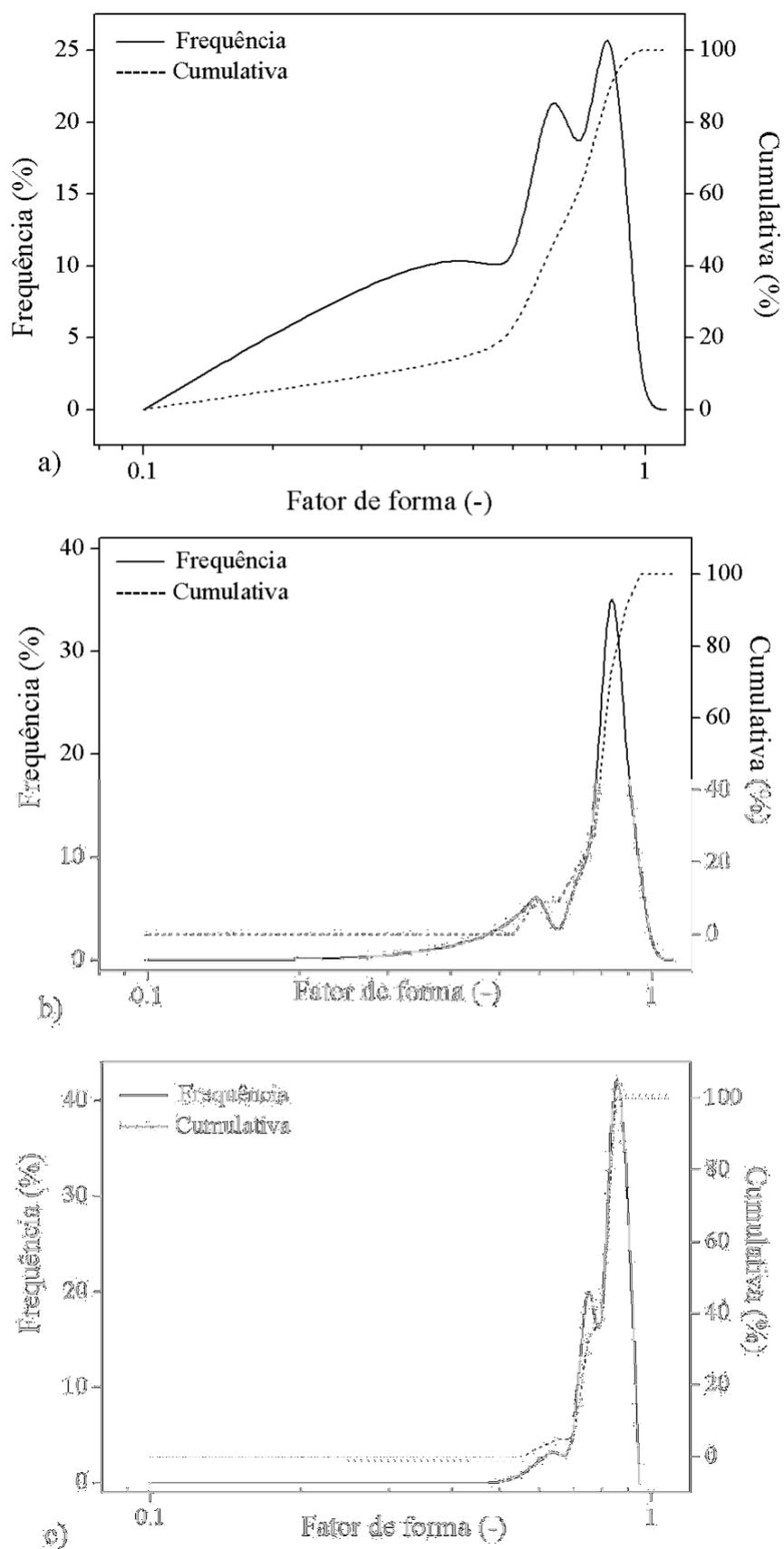


Figura 21. Distribuição de fator de forma celular após 24 h de cultura: a) controle; b) membrana CB1 e c) membrana CB2.

A Figura 22 mostra imagens de microscopia óptica de fibroblastos após adesão e proliferação em 24 h na membrana CB1 (Fig. 22a) e CB2 (Fig. 22c) e em seus respectivos controles (Fig. 22b e 22d). Após a semeadura dos fibroblastos praticamente todas as células aderiram nas membranas CB1 e CB2. Na membrana CB1 as células não se distribuíram completamente, evidenciando maior densidade celular e agrupamentos em determinadas regiões (Fig. 22a). Já na CB2 as células mostraram uma distribuição mais homogênea na superfície da membrana, mas também apresentaram agrupamentos (Dados não apresentados).

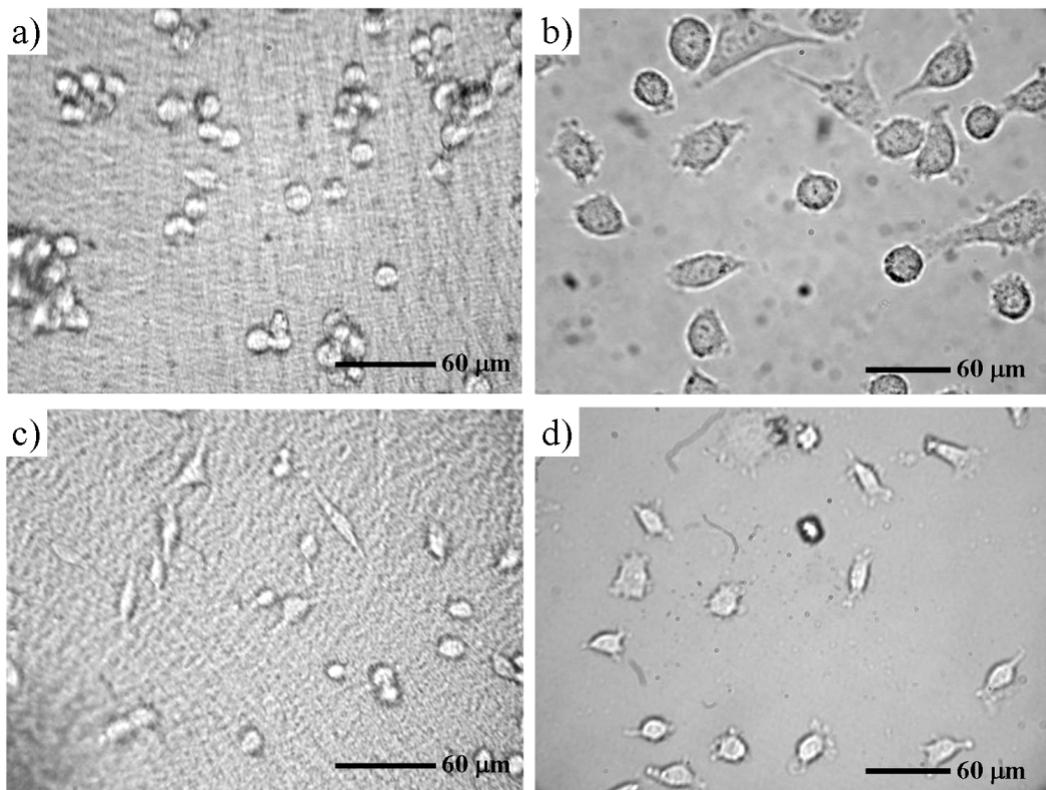


Figura 22. Microscopia óptica evidenciando a proliferação dos fibroblastos, após 24 h de cultura: a) na membrana CB1; b) controle da CB1; c) na membrana CB2; d) no controle da CB2.

Este fenômeno de agrupamento que ocorreu na CB1 pode ser explicado pela maior força de adesão entre os próprios fibroblastos, em comparação com a adesão entre os fibroblastos e a membrana. Adicionalmente, fibroblastos interconectados apresentam natureza contrátil. Então, se a força de contração entre a rede interconectada das células

for mais intensa do que a força de adesão entre os fibroblastos e a membrana, grupos de células serão formados (Sancha vanakit *et al.*, 2006).

A detecção menor de fibroblastos aderidos encontrados nestes testes de adesão, em relação às contagens de proliferação e viabilidade, pode ter sido influenciada pelas diversas etapas de lavagem durante o procedimento de coloração das células, como relatado por Groth e Altankov (Groth e Altankov, 1996). Outros fatores também podem interferir neste tipo de ensaio de adesão, como o número da passagem celular e a distribuição homogênea ou não das células sobre o substrato.

A proliferação das células de mamíferos pode ser definida como um aumento no número de células resultante da finalização do ciclo de divisão celular em resposta a sinais extracelulares (Pardee, 1989 *apud* Tapinos, 2005).

Após 24 h de cultivo, observou-se uma significativa proliferação celular tanto nas membranas CB1 e CB2 quanto em seus controles, como mostram os dados de proliferação da Figura 23.

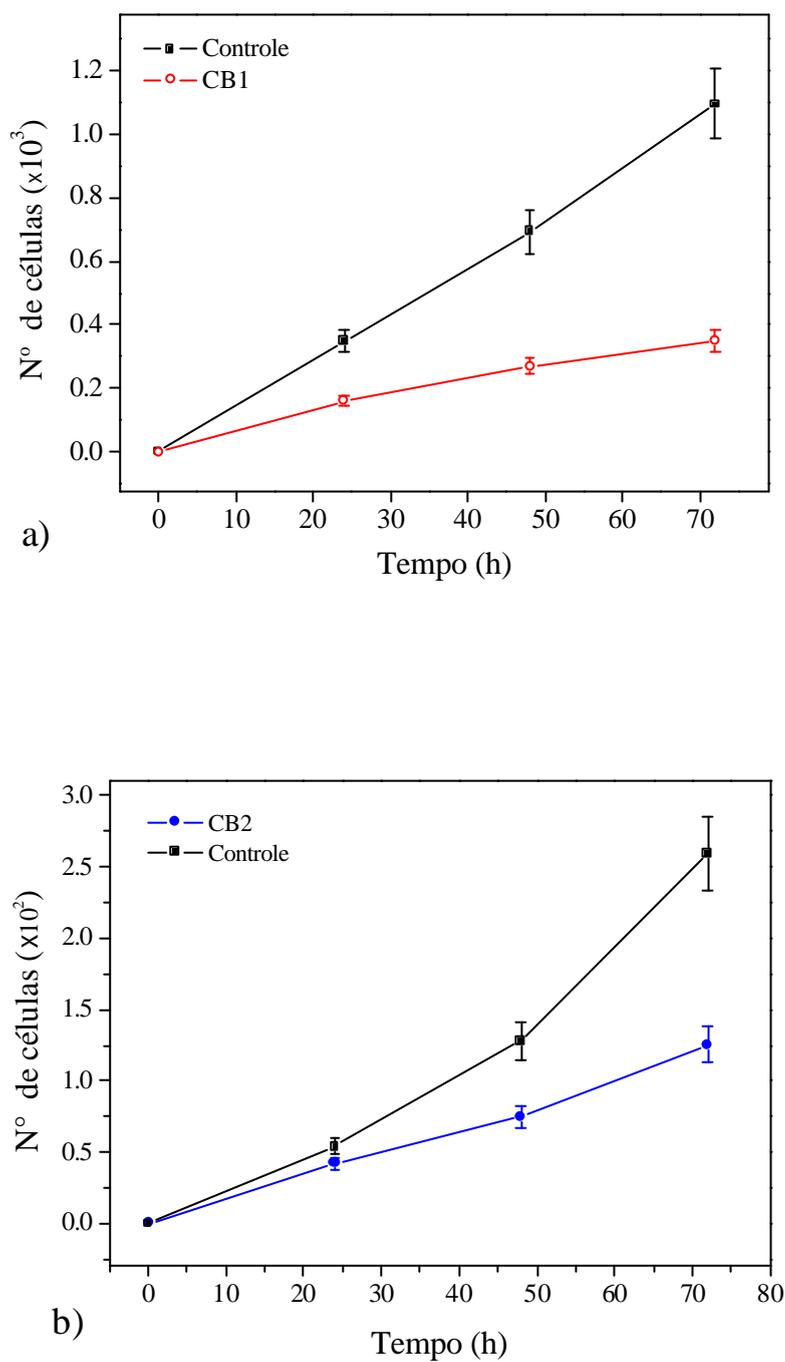


Figura 23. Proliferação dos fibroblastos na membrana a) CB1 e controle e b) CB2 comercial e controle, em função do tempo de cultura.

Um aumento significativo de fibroblastos foi medido após 72 h de cultura, que corresponde a cerca de 450% na membrana CB2. A taxa de proliferação dos

fibroblastos nas membranas foi menor do que nas superfícies de poliestireno dos controles. Backdahl e colaboradores (Backdahl *et al.*, 2006) descrevem o mesmo comportamento proliferativo de células de músculo liso humano em membranas de CB.

As membranas CB1 foram esterilizadas por UV durante 30 minutos, o que pode ter influenciado na estrutura do polímero, e provocado mudanças no comportamento adesivo e proliferativo das células em contato com a membrana. A proliferação dos fibroblastos em superfícies de silicone tratadas com UV é menor em substratos tratados apenas com descarga luminescente de rádio-frequência (RFGD), ou em combinação com tratamento com UV, como reportado por den Braber e colaboradores (den Braber *et al.*, 1996).

Quando as membranas CB1 e CB2 comercial são comparadas, em relação à proliferação celular em função do tempo, pode-se perceber que o número de células nas membranas CB1 é superior ao número de células na membrana CB2. A CB1 mostrou-se um substrato melhor para a proliferação celular do que a CB2 comercial (Ver Figura 24).

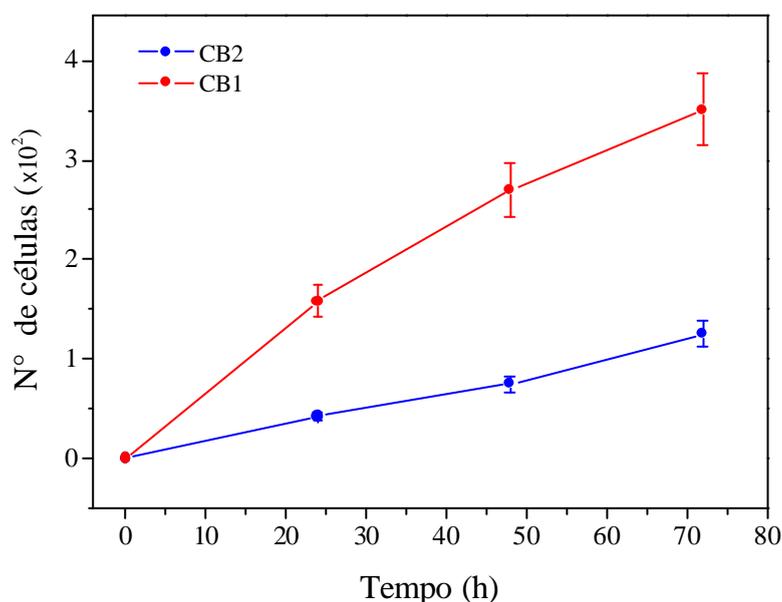


Figura 24. Comparação da proliferação dos fibroblastos entre as membranas CB1 e CB2 em função do tempo de cultura.

Neste trabalho, a adesão e a proliferação foram analisadas durante curtos períodos de cultura (0 a 72 h). O perfil das curvas de proliferação dos fibroblastos crescidos na placa de cultura e dos crescidos nas membranas de celulose foi similar. Entretanto, evidenciou-se que nas membranas de celulose bacteriana as taxas de adesão e proliferação foram sempre menores do que as mesmas células semeadas nos controles.

Os resultados mostraram-se similares aos obtidos por Serrano e colaboradores (Serrano *et al.*, 2004), que utilizaram membranas de PCL como substrato para cultura da linhagem L929 e também observaram adesão e proliferação celulares menores do que nas placas de poliestireno, utilizadas como controle em curtos períodos de cultura.

A molhabilidade dos substratos é um fator que influencia na adesão e na proliferação celular. O efeito adverso do substrato hidrofóbico nas células, em se tratando da adesão e proliferação, se deve à transferência prejudicada da sinalização de proteínas entre o substrato e o interior da célula (Groth e Altankov, 1996). A CB1 apresentou molhabilidade maior do que a CB2 comercial, sendo mais hidrofílica, e nela observaram-se números maiores de células aderidas e de proliferação.

A Figura 25 apresenta micrografias de MEV das culturas celulares sobre a membrana de CB1. A Figura 25a mostra em detalhe a microestrutura de superfície da membrana celulósica, formada por longas fibras com diâmetros de aproximadamente 100 nm, entrelaçadas e dispostas homoganeamente. Os fibroblastos aderidos à superfície, após 24h, apresentaram-se distribuídos com densidade média de 410 células/mm² para CB1 e de 250 células/mm² para CB2, além de formatos arredondados em sua maioria (Ver Figura 21b). Apenas uma célula apresenta um formato alongado, típico de um fibroblasto (indicado pela seta na Figura 25b).

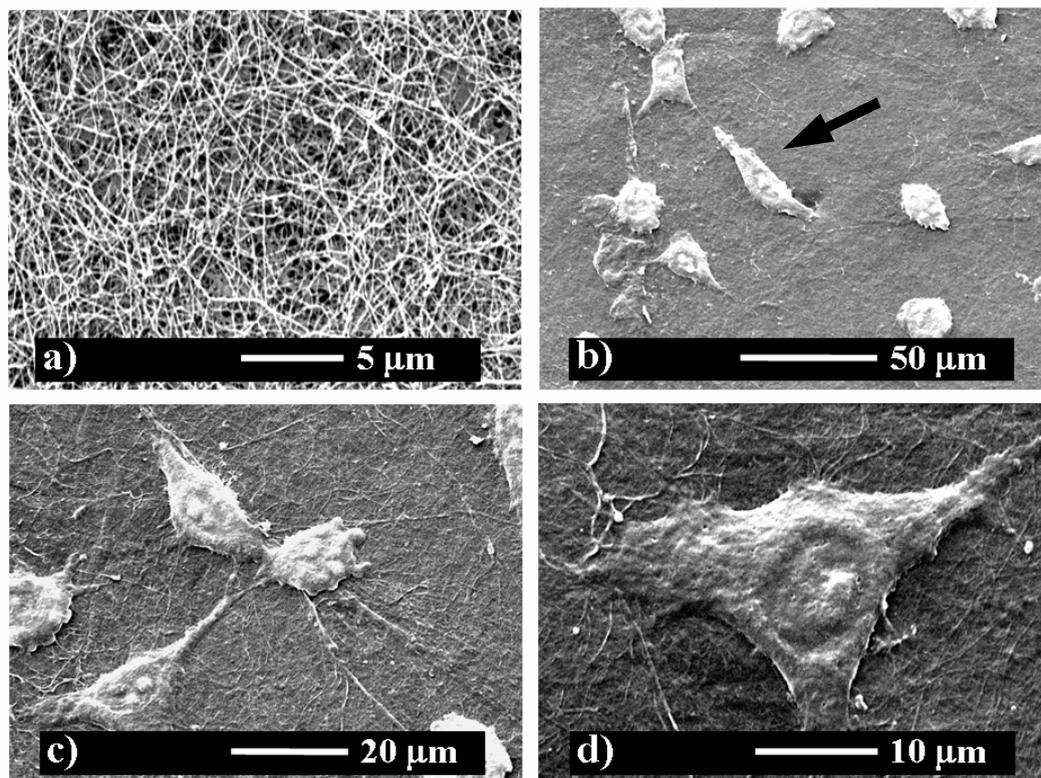


Figura 25. Micrografias de MEV de cultura de fibroblastos em membrana de CB1, após 24 h de cultura. a) detalhe da superfície da membrana celulósica, b) células aderidas à membrana. A seta indica uma célula com formato de fibroblasto, c) e d) diferentes magnitudes, evidenciando o formato celular.

Detalhes da adesão dessas células na membrana podem ser vistos nas Figuras 25c e 25d. As protuberâncias formadas pelos fibroblastos interagem com as nanofibras celulósicas da membrana, conferindo adesão a essas células. Pode-se afirmar que os fibroblastos aderem e proliferam nas membranas de celulose bacteriana, estando de acordo com os resultados obtidos nas medidas de adesão e proliferação.

A Figura 26 apresenta micrografias de MEV das culturas celulares sobre a membrana de CB2. A Figura 26a mostra detalhes da microestrutura da superfície da CB2, formada por nanofibras com diâmetros de aproximadamente 100 nm, entrelaçadas. Aparentemente as fibras dessa membrana também estão dispostas homogeneamente, como na CB1. Os fibroblastos aderidos à superfície, após 24h,

apresentaram-se distribuídos com densidade média de 250 células/mm², e também formatos arredondados em sua maioria (Ver Figuras 21b e 21c).

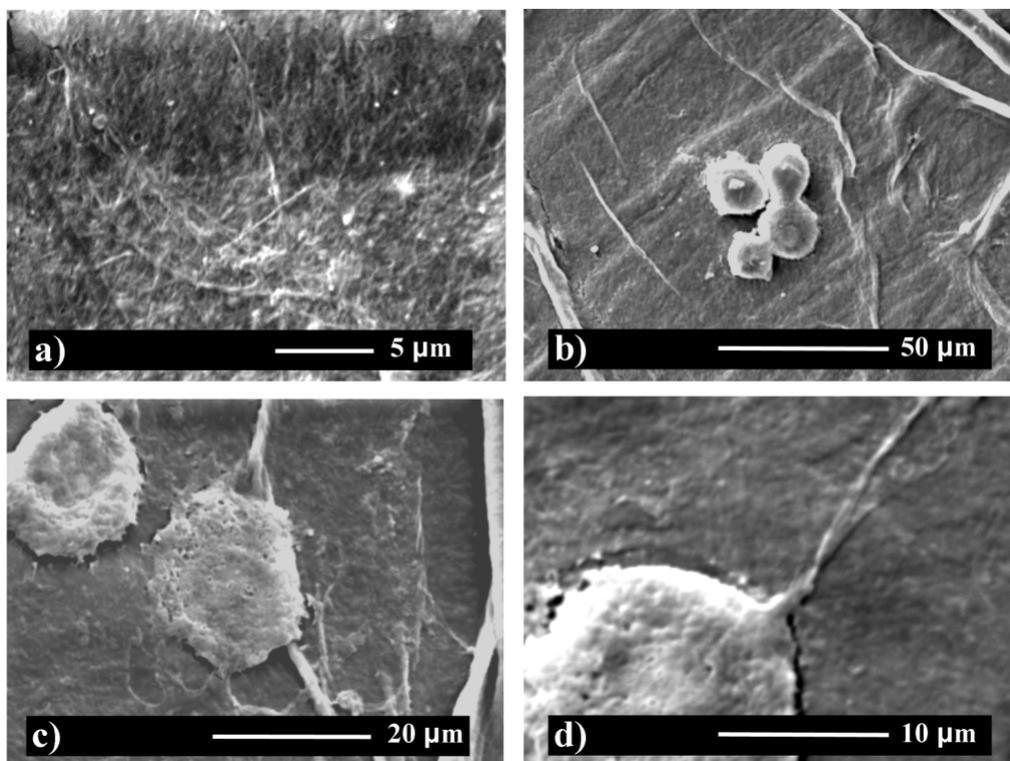


Figura 26. Micrografias de MEV de cultura de fibroblastos em membrana de CB2, após 24 h de cultura. a) detalhe da superfície da membrana celulósica, b) células aderidas à membrana, c) e d) diferentes magnitudes, evidenciando o formato celular.

A mobilidade relativa das células nas membranas CB1 e CB2 foi qualitativamente avaliada. As micrografias ópticas das Figuras 27 e 28 apresentam a evolução temporal, a partir de uma configuração inicial (após 24h) das células nas duas membranas. Observam-se movimentos em direções e com velocidades distintas, tanto na membrana CB1 (Figura 27), quanto na CB2 (Figura 28). Devido à quantidade e complexidade de fatores que influenciam a migração celular, aliada a aleatoriedade de direções e velocidades, torna-se difícil uma avaliação precisa da cinética de migração. Procurou-se, então, apresentar resultados que fornecessem uma base para afirmar que, apesar da forte característica de adesão dos fibroblastos às membranas, ocorre a migração. As setas indicam as direções de migração das células.

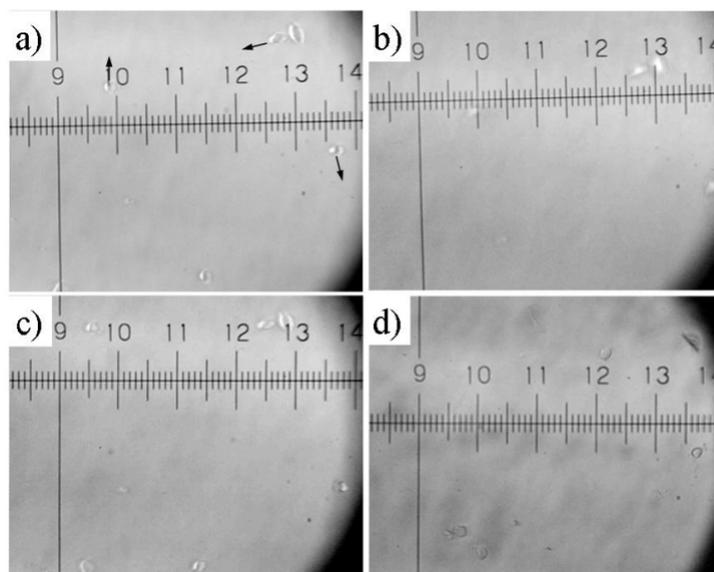


Figura 27. Células na membrana CB1 em diferentes tempos de cultura a) 24h de adesão, b) 26 h, c) 29h e d) 42h.

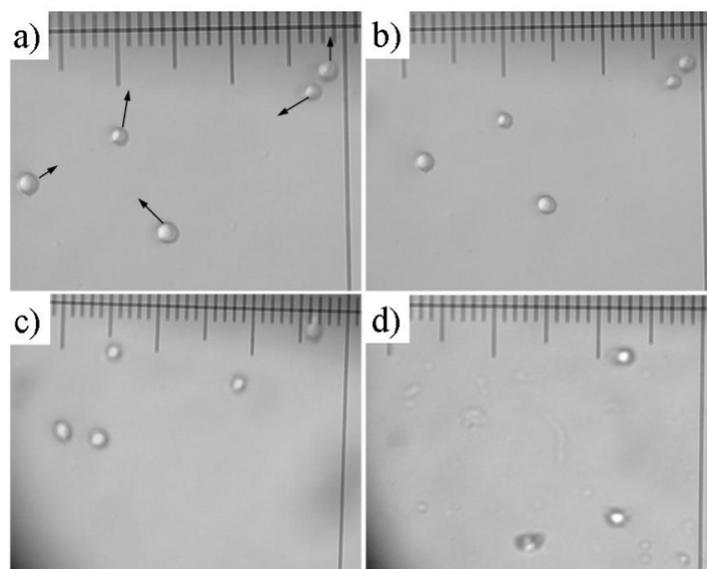


Figura 28. Células na membrana CB2 em diferentes tempos de cultura a) 24h de adesão, b) 26h, c) 29h e d) 42h.

Para a avaliação da viabilidade celular, a porcentagem de células viáveis após a semeadura nas membranas após 24, 48 e 72 h foi medida e comparada aos controles. A Figura 29a mostra as curvas de viabilidade celular na membrana CB1 e em seu controle e 29b na CB2 e em seu controle. Nas duas condições de cultura, os fibroblastos permaneceram viáveis após 72 h. Observa-se, após 72 h, um aumento substancial de

células viáveis tanto para o controle (acima de 3500% para controle CB1 e 448% para controle CB2, em relação à quantidade inicial de cultura) quanto para as membranas (acima de 750% CB1 e 216% CB2). Esse aumento está associado à proliferação celular, isto é, a um aumento constante no número de células.

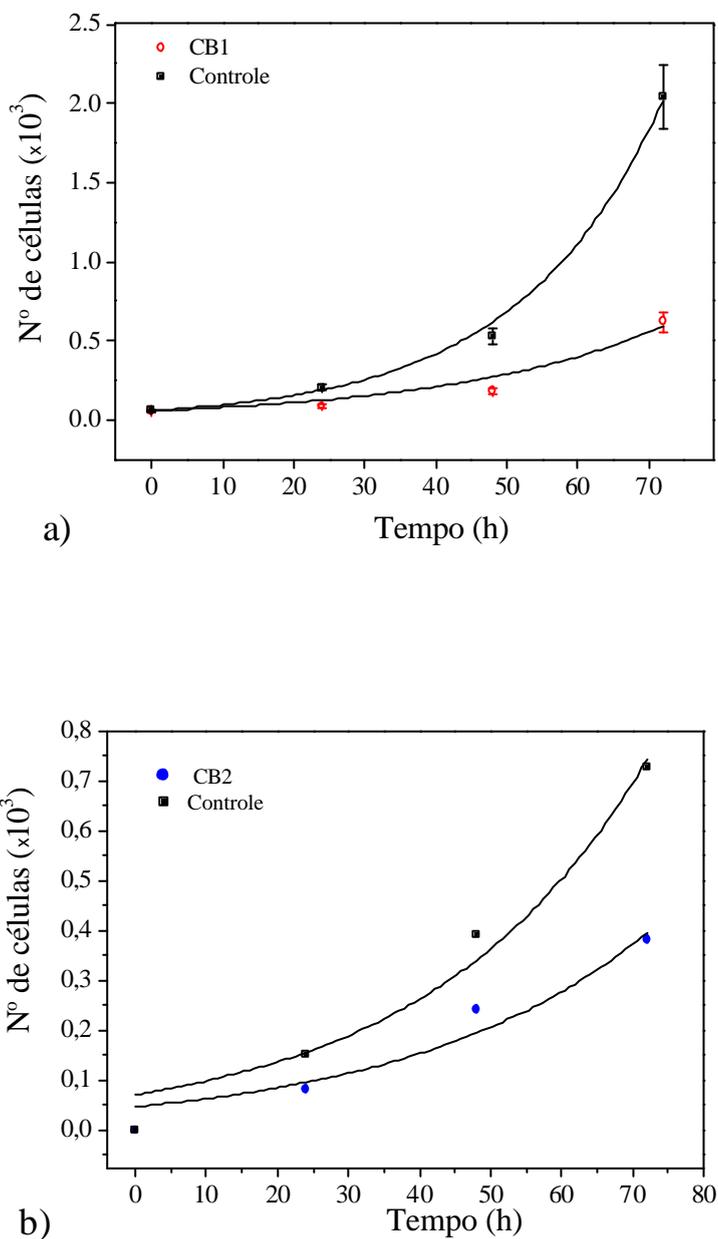


Figura 29. Dados de viabilidade celular na membrana a) CB1 e controle e b) CB2 e controle. As curvas representam ajustes da Equação 2 aos dados experimentais.

As células tipicamente proliferam numa taxa proporcional ao número de células presentes, X , de acordo com a Equação 2:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2)$$

cuja solução temporal, para μ constante, é uma exponencial crescente da forma:

$$X(t) = X_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

onde X_0 é o número inicial de células e μ é a velocidade específica de crescimento da fase exponencial. A Equação 3 foi ajustada aos dados experimentais de crescimento celular mostrados na Figura 29. Os valores de μ obtidos encontram-se na Tabela II.

Tabela II. Valores de velocidade específica de crescimento, μ , obtidos após ajuste da Equação 2 aos dados experimentais, com os respectivos coeficientes de correlação, R^2 .

	μ (h^{-1})	R^2
Membrana CB1	0,032	0,945
Controle	0,049	0,997
Membrana CB2	0,029	0,943
Controle	0,049	0,974

Os valores de μ foram iguais para os controles e muito semelhantes entre as membranas. Entretanto, as células na membrana CB1 cresceram a uma velocidade específica de $0,032 \text{ h}^{-1}$, enquanto que a CB2 comercial teve valor ligeiramente menor, de $0,029 \text{ h}^{-1}$. Este valor pode ser um indicativo da maior adesão e proliferação para a membrana CB1, dentro dos desvios considerados.

Os desvios observados com relação aos dados refletem limitações do modelo, que não leva em conta outros fatores que contribuem para a população celular, tais como morte celular e estágio de diferenciação. Além disso, μ é uma função de muitas

variáveis (aqui não apresentadas), como fatores de crescimento, concentração de oxigênio, entre outros.

Quando as membranas foram comparadas entre si, a membrana CB1 apresentou-se mais hidrofílica, com um maior número de células aderidas, e maiores taxas de proliferação e viabilidade celulares do que a membrana CB2 comercial. A CB1 também apresentou um ganho de massa maior do que a CB2 o que pode sugerir uma maior adsorção de proteínas e interferir na adesão celular, proporcionando um substrato que melhor promova a adesão.

Os resultados obtidos demonstraram que as membranas de celulose bacteriana não são citotóxicas e suportam tanto a adesão, quanto a proliferação e a viabilidade celular, porém em menores proporções quando comparadas ao controle.

Deve-se levar em conta ainda que condições *in vitro* não reproduzem situações *in vivo* com fidelidade, devido ao grande número de fatores que devem ser levados em consideração. Porém, é possível determinar as reações celulares básicas e singulares para um único tipo de célula em meio de cultura *in vitro*. Embora isso não represente completamente as reações celulares *in vivo*, pode dar uma idéia de como diferentes tipos celulares podem responder. Estes métodos podem ser usados para reduzir o número de testes de biocompatibilidade executados *in vivo*, e fazem parte de um grande repertório de testes de citocompatibilidade para biopolímeros (Baxter *et al*, 2002).

Um maior entendimento sobre os biomecanismos envolvidos nos processos celulares em contato com biomateriais pode colaborar para a ampliação do uso de materiais como a celulose bacteriana na engenharia de tecidos.

A celulose bacteriana é um material natural e produzido em abundância, puro, biocompatível e possui uma estrutura nanofibrilar única, além de ter possibilidades de moldabilidade em sua produção, podendo ser modificada e incrementada com produtos terapêuticos tanto em sua síntese, através de mudanças genéticas nas bactérias, quanto com tratamentos posteriores à sua síntese. Pesquisas interdisciplinares são necessárias, para explorar a versatilidade e a potencialidade da celulose bacteriana como material biomédico, e para fazer deste biomaterial um candidato com maiores benefícios para a medicina moderna e engenharia de tecidos.

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões

5.1 Conclusões

Neste trabalho foi estudado o comportamento de fibroblastos cultivados *in vitro* sobre membranas de celulose bacteriana produzidas em laboratório e comercial. Diferentes aspectos celulares foram analisados para conhecer o comportamento celular durante a cultura dos fibroblastos L929: adesão, proliferação, morfologia e viabilidade.

Este estudo investigou a resposta celular da linhagem de fibroblastos L929 em contato com membranas de celulose bacteriana, e contribuiu para um melhor entendimento das interações células-substrato, que se fazem tão importantes para o desenvolvimento e sucesso de produtos médicos de engenharia de tecidos. Os fibroblastos, em contato com as membranas de celulose bacteriana, permaneceram com um formato arredondado, entretanto houve adesão, proliferação, migração e viabilidade celular nos intervalos de cultura estudados, porém em menores proporções do que os controles.

O presente trabalho explorou a dinâmica da interação de células – biomaterial para obter informações quantitativas e qualitativas do comportamento celular. Novas investigações devem ser realizadas para elucidar os mecanismos relacionados às interações célula-substrato, de modo a estabelecer parâmetros de controle e otimização de produtos biomédicos.

Foram também investigadas as propriedades físico-químicas das membranas de celulose bacteriana, para entender e correlacionar as características que influenciam no comportamento das células em contato com esses materiais. A membrana CB1 mostrou-se um substrato que promove melhor a adesão, proliferação e viabilidade celular em comparação com a membrana CB2 comercial.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Estudos com culturas de células em tempos mais prolongados devem ser feitos para complementar os dados obtidos para culturas de curto prazo e verificar através dos mesmos parâmetros o comportamento celular desta linhagem, bem como o de outras linhagens celulares.

Ensaio de biologia molecular podem auxiliar e ampliar os conhecimentos a respeito do padrão de expressão protéica nas células em contato com os biopolímeros, sendo que poderão ser identificadas mudanças na expressão de proteínas de citoesqueleto e sua interferência na adesão celular, já que a morfologia arredondada permanece nas células em contato com as membranas de celulose bacteriana.

Pesquisas com o objetivo de incorporação de medicamentos nas membranas de celulose bacteriana para implantes farmacologicamente ativos, produção de *scaffolds* tridimensionais e mais testes *in vitro* e também *in vivo* com este biopolímero poderão dar continuidade a este trabalho.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v.21, n.7, p.667-681. 2000.

BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v.27, n.9, p.2141-9. 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.1, p.13-21. 2005.

BAXTER, L. C.; FRAUCHIGER, V.; TEXTOR, M.; AP GWYNN, I.; RICHARDS, R. G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **Eur Cell Mater**, v.4, p.1-17. 2002.

BOULMEDAIS, F.; FRISCH, B.; ETIENNE, O.; LAVALLE, P.; PICART, C.; OGIER, J.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; EGLES, C. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. **Biomaterials**, v.25, n.11, p.2003-2011. 2004.

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v.17, n.2, p.137-146. 1996.

BROWN, R. M., JR.; WILLISON, J. H.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.73, n.12, p.4565-9. 1976.

BRUNETTE, D. M.; CHEHROUDI, B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. **Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme**, v.121, n.1, p.49-57. 1999.

CHAPEKAR, M. S. Tissue engineering: challenges and opportunities. **J Biomed Mater Res**, v.53, n.6, p.617-20. 2000.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v.26, n.33, p.6565-6578. 2005.

CHO, C. S.; KOBAYASHI, A.; GOTO, M.; PARK, K. H.; AKAIKE, T. Difference in adhesion and proliferation of fibroblast between Langmuir-Blodgett films and cast

surfaces of poly(γ -benzyl L-glutamate)/poly(ethylene oxide) diblock copolymer. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.32, n.3, p.425-432. 1996.

CRAIGHEAD, H. G.; JAMES, C. D.; TURNER, A. M. P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.5, n.2-3, p.177-184. 2001.

CROCE, M. A.; SILVESTRI, C.; GUERRA, D.; CARNEVALI, E.; BORALDI, F.; TIOZZO, R.; PARMA, B. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. **J Biomater Appl**, v.18, n.3, p.209-22. 2004.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M., JR. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v.27, n.2, p.145-51. 2006.

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. 2007.

DEE, K. C.; ANDERSEN, T. T.; BIZIOS, R. Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.40, n.3, p.371-377. 1998.

DEN BRABER, E. T.; DE RUIJTER, J. E.; SMITS, H. T.; GINSEL, L. A.; VON RECUM, A. F.; JANSEN, J. A. Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface micro-grooves. **Biomaterials**, v.17, n.11, p.1093-9. 1996.

FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl Biochem Biotechnol**, v.24-25, p.253-64. 1990.

GEORGE, J.; RAMANA, K.; SABAPATHY, S.; BAWA, A. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, n.8-9, p.1323-1327. 2005.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.37, n.4, p.189-194. 2005.

GOTOH, Y.; TAMADA, Y. In vitro study of initial cell attachment to the surfaces coated with conjugates consisting of silk fibroin and chitoooligosaccharides. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v.74, n.2, p.39-45. 2005.

GROTH, T.; ALTANKOV, G. Studies on cell-biomaterial interaction role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. **Biomaterials**, v.17, n.12, p.1227-1234. 1996.

GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, n.3, p.345-57. 1996.

HELBERT, W.; SUGIYAMA, J.; KIMURA, S.; ITOH, T. High-resolution electron microscopy on ultrathin sections of cellulose microfibrils generated by glomerulocytes in Polyzoa vesiculiphora. **Protoplasma**, v.203, n.1-2, p.84-90. 1998.

HELENIUS, G.; BACKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **J Biomed Mater Res A**, v.76, n.2, p.431-8. 2006.

HOENICH, N. Cellulose for medical applications: past, present, and future. **BioResources**, v.1, n.2, p.270-280. 2006.

HOKUGO, A.; TAKAMOTO, T.; TABATA, Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. **Biomaterials**, v.27, n.1, p.61-7. 2006.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v.4, n.7, p.518-524. 2005.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v.3, n.10, p.589-601. 2006.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, n.27, p.5474-5491. 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v.26, n.9, p.1561-1603. 2001.

KOYAMA, M.; HELBERT, W.; IMAI, T.; SUGIYAMA, J.; HENRISSAT, B. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.17, p.9091-9095. 1997.

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.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. **Cell**, v.84, n.3, p.359-369. 1996.

LO, C. M.; WANG, H. B.; DEMBO, M.; WANG, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. **Biophys J**, v.79, n.1, p.144-52. 2000.

LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nat Biotechnol**, v.23, n.1, p.47-55. 2005.

MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v.20, n.12, p.1133-1142. 1999.

MANTANIS, G. I.; YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. Swelling of Compressed Cellulose Fiber Webs in Organic Liquids. **Cellulose**, v.2, n.1, p.1-22. 1995.

MARTSON, M.; VILJANTO, J.; HURME, T.; LAIPPALA, P.; SAUKKO, P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. **Biomaterials**, v.20, n.21, p.1989-1995. 1999.

MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; PECORARO, E.; MANZANI, D. **Relatório de caracterização físico-química da membrana de celulose BIONEXT**. 2004. 11 f. Relatório técnico - Instituto de Químico, UNESP, Araraquara - SP.

MIN, B. M., LEE, G., KIM, S. H., NAM, Y. S., LEE, T. S., PARK, W. H. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v.25, n.7-8, p.1289-1297. 2004.

MULLER, F. A.; MULLER, L.; HOFMANN, I.; GREIL, P.; WENZEL, M. M.; STAUDENMAIER, R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, n.21, p.3955-3963. 2006.

MUSCHLER, G. F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **J Bone Joint Surg Am**, v.86-A, n.7, p.1541-58. 2004.

NAKAGAITO, A. N.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. **Applied Physics a-Materials Science & Processing**, v.80, n.1, p.93-97. 2005.

NARITOMI, T.; KOUUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.1, p.89-95. 1998.

NEHRER, S.; BREINAN, H. A.; RAMAPPA, A.; SHORTKROFF, S.; YOUNG, G.; MINAS, T.; SLEDGE, C. B.; YANNAS, I. V.; SPECTOR, M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro (vol 38, pg 95, 1997). **Journal of Biomedical Materials Research**, v.38, n.4, p.U3-U3. 1997.

OSULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v.4, n.3, p.173-207. 1997.

PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. **Tissue Engineering**. New Jersey: Prentice Hall. 2004. 407 p.

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. **Biomaterials**, v.27, n.17, p.3209-3220. 2006.

RAE, T. Cell biochemistry in relation to the inflammatory response to foreign materials, In: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Williams DF, ed. . p.159-181. 1981.

RICHARDS, R. G. The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. **Injury-International Journal of the Care of the Injured** v.27, p.38-43. 1996.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v.55, n.1, p.35-58. 1991.

SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGRUJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Progress**, v.22, n.4, p.1194-1199. 2006.

SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K.; OKUDA, K.; BROWN, R. M. Characterization of Genes in the Cellulose-Synthesizing Operon (Acs Operon) of *Acetobacter-Xylinum* - Implications for Cellulose Crystallization. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.18, p.5735-5752. 1994.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. **Cellulose**, v.12, n.3, p.223-231. 2005.

SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter-Xylinum* .3. Substrates and Inhibitors. **Biochemical Journal**, v.67, p.669-679. 1957.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGI, M.; PENA, J.; RAMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLES, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v.25, n.25, p.5603-5611. 2004.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v.52, p.443-451. 2001.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTEBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v.26, n.4, p.419-31. 2005.

TOKOH, C.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. **Cellulose**, v.5, n.4, p.249-261. 1998.

VERRIER, S.; BAREILLE, R.; ROVIRA, A.; DARD, M.; AMEDEE, J. Human osteoprogenitor responses to orthopaedic implant: Mechanism of cell attachment and cell adhesion. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v.7, n.1, p.46-51. 1996.

WATANABE, K.; ETO, Y.; TAKANO, S.; NAKAMORI, S.; SHIBAI, H.; YAMANAKA, S. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. A new bacterial cellulose substrate. **Cytotechnology**, v.13, n.2, p.107-14. 1993.

WATANABE, K.; TABUCHI, M.; MORINAGA, Y.; YOSHINAGA, F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, v.5, n.3, p.187-200. 1998.

WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P.; HOROWITZ, D. M.; PEOPLES, O. P. PHA applications: Addressing the price performance issue I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, n.1-3, p.111-121. 1999.

YANG, X.; ZHAO, K.; CHEN, G. Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v.23, n.5, p.1391-7. 2002.

(<http://www.nce.ufrj.br/bcrj/busca1.asp?bcrj=CR020>, acesso em 09/08/2007).

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CB	Celulose bacteriana
CB1	Celulose produzida em laboratório
CB2	Celulose comercial (BIONEXT [®])
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DRX	Difratometria de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RFGD	Descarga Luminescente de Rádio-frequência
SBF	Soro fetal bovino
T_d	Temperatura de transição vítrea
TG	Curva termogravimétrica
T_g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
X_c	Grau de cristalinidade