

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA**

MILTON PAULO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM
EQUIVALENTES DE PELE HUMANA**

PORTO ALEGRE

2009

MILTON PAULO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM
EQUIVALENTES DE PELE HUMANA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Medicina e
Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul. Área de
concentração: Cirurgia

Orientador: Prof. Jefferson Braga da Silva, MD, PhD

Co-orientadora: Profa. Denise Machado Cantarelli, MSc, PhD

PORTO ALEGRE

2009

O48a Oliveira, Milton Paulo de.
Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana / Milton Paulo de Oliveira ; orient. Jefferson Braga da Silva, co-orient. Denise Cantarelli Machado. Porto Alegre: PUCRS, 2009.
71 f.: gráf. il. tab.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Cirurgia.

1. Pele Artificial. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Teste de Materiais. 4. Proliferação de Células. 6. Citotoxicidade. 7. In Vitro. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Machado, Denise Cantarelli. III. Título.

CDD 616.5
NLM WR 140

Bibliotecária Responsável:
Sabrina Caimi Silva da Costa
CRB10/1606



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0

ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 217

Aos vinte e cinco dias do mês de agosto do ano de dois mil e nove, no Curso de Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul foi concluído o processo de avaliação da dissertação intitulada "ANÁLISE IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM EQUIVALENTES DE PELE HUMANA" de autoria do pós-graduando **Milton Paulo de Oliveira** sob a orientação do Professor Doutor Jefferson Luis Braga da Silva. A comissão examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Carlos Alexandre Netto (UFRGS), Dr. Plínio Carlos Baú (HSL/PUCRS) e Dr. Cláudio Corá Mottin (PUCRS). O aluno foi **APROVADO**. Para constar, lavrou-se esta ata que deverá ser anexada à documentação exigida para posterior expedição do diploma. A presente ata foi assinada pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Porto Alegre, aos vinte e cinco dias do mês de agosto do ano de dois mil e nove.


Magda Lahorgue Nunes

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido concebido sem as inúmeras intervenções do Prof. Carlos Cezar Fritscher, MD, PhD., Diretor Médico do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no qual mostrou extrema sensibilidade aos problemas ocorridos durante a realização desse trabalho, atuando com a dignidade e transparência, qualidades que lhe são, reconhecidamente, peculiares. A ele e ao Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sou e serei eternamente grato.

Agradeço a contribuição de um grande número de profissionais que, no anonimato, com entusiasmo, experiência e profissionalismo, não só me apoiaram como ajudaram e engrandeceram a pesquisa.

Em especial a minha esposa Deisy, meus filhos Felipe e Fernanda, a quem privei de minha companhia, e todos os meus familiares que souberam compreender minha ausência e inquietude durante os anos de elaboração desta pesquisa.

Aos meus orientadores Prof. Jefferson Braga da Silva, MD, PhD e Profa. Denise Cantarelli Machado, MSc, PhD. pela compreensão, apoio e dedicação do desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Jaderson Costa da Costa, MD, PhD pelo estímulo e disponibilização do Instituto de Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, onde esse trabalho foi realizado na sua íntegra.

Aos meus colegas e aos residentes do Serviço de Cirurgia Plástica quero também agradecer pela colaboração direta ou indireta, no apoio ao meu projeto.

Faço agradecimento especial ao biólogo Christian Viezzer o qual foi fundamental em todos os procedimentos laboratoriais da pesquisa, e pela inestimável contribuição e estímulo desde o início deste trabalho.

Sou grato a todos meus amigos, grandes incentivadores, fundamentais nos momentos mais cruciais deste trabalho, aos quais sempre foram testemunhos de que as coisas mais preciosas que tenho, em minha vida, não podem ser compradas.

RESUMO

Introdução: Há uma grande necessidade de suprir a demanda por enxertos de pele autólogos humanos, fundamentais para tratamento de pacientes sujeitos as situações particulares como úlceras, queimaduras, traumas entre outras. Polímeros naturais e sintéticos têm sido desenvolvidos e empregados como biomaterias. A aplicação de testes visando avaliar o comportamento celular na presença do biomaterial in vitro poderá abreviar as etapas necessárias para atestar sua biocompatibilidade. A análise com as metodologias proposta pelas normas da ISO 10993 permite o estabelecimento de uma escala ordenada e racional para a biocompatibilidade dos materiais em função de sua citotoxicidade. Essa padronização poderá auxiliar na comparação de diversos biomateriais utilizados em estudos e, na produção de novas matérias, contribuindo para o desenvolvimento da bioengenharia dos tecidos. Os materiais analisados e utilizados como equivalentes de pele humana podem ter sua citotoxicidade mediada por alterações da função mitocondrial das células, determinada pelo teste de MTT. **Objetivos:** (1) Avaliar a citotoxicidade dos extratos dos Equivalentes de Pele Humana (EPH) Veloderm[®] e Biopiel[®] no cultivo de fibroblastos da linhagem celular NIH-3T3, através do teste colorimétrico de MTT; (2) classificação dos extratos puros dos EPH através de escala de citotoxicidade, de acordo com as normas da ISO 10993. **Metodologia:** Foram utilizados como substâncias-teste extratos de Equivalentes de Pele Humana (EPH) Veloderm[®] (VL) e Biopiel[®] (BP). Fibroblastos da linhagem NIH-3T3 foram semeados em três placas de cultural de 96 poços na concentração de $4,5 \times 10^4$ células por poço. As células foram cultivadas na presença de concentrações distintas dos extratos das substâncias-teste, obtidos segundo as normas da ISO 10993 por 24, 48, e 72 horas para a determinação do grau de citotoxicidade das substâncias-teste quando comparadas ao controle de positivo (CP) e negativo de citotoxicidade (CN), através do teste de MTT. **Resultados:** na comparação entre os Grupos (CN, CP, BP, VL), os dados mostraram que houve diferença significativa na citotoxicidade ($p < 0,001$) no CP contra CN, BP e VL dos extratos puros de cultivo, nos diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Não houve diferença significativa da citotoxicidade do Grupo BP e VL contra CN. Houve diferença de citototoxicidade ($p = 0,01$) quando extratos de 10% em cultura celular de 48 horas foram usados nos Grupos VL ($17,4 \pm 1,4$) e BP ($14,5 \pm 0,6$). Uma diferença também foi detectada na citotoxicidade ($p = 0,014$) no Grupo BP em 48 horas de cultura, entre o extrato de 10% ($14,5 \pm 0,6$) contra os extratos de

60% ($16,7 \pm 1,0$) e 100% ($17,0 \pm 1,3$). O Grupo VL em cultura de 72 horas mostrou uma diferença na citotoxicidade ($p=0,041$) quando comparados os extratos de 60% ($21,3 \pm 1,6$) e 100% ($17,5 \pm 2,1$). A viabilidade celular dos extratos do Veloderm[®] e Biopiel[®] independente do tempo de exposição e concentração encontraram-se entre 75% e 100% na comparação com CN. Segundo a classificação baseado na ISO 10993, ambos os extratos puros de EPH foram definidos não tóxicos (NT). **Conclusão:** O conjunto dos resultados sugere alta biocompatibilidade dos EPHs testados; entretanto, o teste colorimétrico de MTT representa uma avaliação inicial, sendo importante seu papel na racionalização da experimentação in vivo e clínica dos biomateriais. Esta hipótese precisa ser confirmada com testes complementares segundo normas da ISO 10993.

Palavras-Chave: Biocompatibilidade. Biomaterial. Citotoxicidade. Substituto de Pele Humana. Equivalente de Pele Humana.

ABSTRACT

Evaluation of in vitro cell behavior with biomaterials may shorten the stages required to certify its compatibility. The methods proposed by ISO 10993 standards allow the ordered, and a rational scale to determine the materials biocompatibility regarding its cytotoxicity. This standardization may help to compare different biomaterials used in experimental studies, and the production of new and safe materials, contributing to the development of tissue bioengineering. Human skin equivalents frequently used may have their cytotoxicity mediated by changes in mitochondrial function, determined by MTT test. The cytotoxicity of Human Skin Equivalents (HSEs) Veloderm[®] and Biopiel[®] in NIH-3T3 cell line fibroblasts culture (4.5×10^4 cells/well) were assayed in the presence of different extracts concentrations according to the ISO 10993 standards per 24, 48 and 72 hours, and the degree of cytotoxicity was determined by the MTT test. There was a difference in cytotoxicity between VL and BP on 48 hours cell cultures when 10% extracts was used ($p=0.01$). A difference was also detected regarding BP concentrations in 48 hours cultures that shown a reduction in cytotoxicity with increasing extracts concentrations (10% to 60%) ($p=0.014$). VL extract concentrations on 72 hours cultures also shown a difference in cytotoxicity, when in cytotoxicity with increasing extracts concentrations (60% to 100%) ($p=0.041$). According to ISO 10993 classifications, both extracts of HSE were defined as non-toxic (NT) suggesting a high biocompatibility of Veloderm[®] and Biopiel[®]. This hypothesis should be confirmed with complementary tests, although the colorimetric MTT test is an initial evaluation to rationalize the application of biomaterials in vivo and in clinical experimentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Comparação de diferentes concentrações dos EPHs na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 cultivados em diferentes períodos de tempo.37
- Figura 2 – Comparação dos extratos em 100% dos EPH e CP em relação à viabilidade celular de fibroblastos da linhagem NIH-3T3, cultivados em diferentes períodos de tempo.38
- Figura 3 – Segmento do documento ISO 10993-1 (demarcado em borda vermelha) no qual foram classificados ambos os EPHs avaliados neste trabalho.41
- Figura 4 – Micrografias obtidas por MEV da superfície do Veloderm[®].43
- Figura 5 – Micrografias obtidas por MEV da superfície do Biopiel[®].43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da taxa de extração de materiais para testes de citotoxicidade de acordo com a espessura e o tipo do material segundo normas da ISO 10993/5 ⁴⁶	32
Tabela 2 – Condições de cultura nos grupos do estudo.....	32
Tabela 3 – Comparação do efeito das diferentes concentrações dos EPHs na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 cultivadas em diferentes períodos de tempo.	35
Tabela 4 - Classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem segundo categorias de toxicidade dos materiais do documento ISO 10993-5: 1999.....	39
Tabela 5 – Classificação dos níveis estratificados de citotoxicidade dos extratos em 100% de concentração segundo normas do documento ISO 10993-5:1999, baseado nos trabalhos de Sleten e Lönroth. ^{68, 69,70}	40

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

3D - tri-dimensional

ANOVA – teste de análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BP – Biopiel[®]

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra-acético

EPH – equivalente de pele humana

EPHd – equivalente de pele humana dérmico

EPHe – equivalente de pele humana epidérmico

FDA – Food and Drug Administration

ISO – International Organization of Standardization

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MG – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

MTT – brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

ng – nanograma

PBS – solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio

pH – potencial hidrogeniônico

rpm – rotação por minuto

s – segundo

SFB – Soro Fetal Bovino

VL - Veloderm[®]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ESTRUTURA DOS TECIDOS	15
2.2	INFLUÊNCIAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	16
2.3	CULTURA DE CÉLULAS.....	17
2.4	EQUIVALENTES DE PELE HUMANA (EPH).....	20
2.5	ESTRATO CÓRNEO (EC): CORRELAÇÃO COM O EQUIVALENTE DE PELE HUMANA EPIDÉRMICO (EPHe)	22
2.6	EQUIVALENTE DE PELE HUMANA EPIDÉRMICO (EPHe) COMPOSTO DE PELÍCULA DE QUITOSANA : BIOPIEL [®]	23
2.7	EQUIVALENTE DE PELE HUMANA EPIDÉRMICO (EPHe) COMPOSTO DE PELÍCULA DE HEMICELULOSE : VELODERM [®]	23
2.8	CITOTOXICIDADE	24
2.9	TESTES IN VITRO	26
3	OBJETIVO	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	30
4.2	EQUIVALENTES DE PELE HUMANA.....	30
4.3	CULTURA CELULAR.....	31
4.4	MEIO DE EXTRAÇÃO DO BIOMATERIAL	31
4.5	CULTURAS PARA AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.....	32
4.6	TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	33
4.7	VIABILIDADE CELULAR EM PORCENTAGEM	33
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS EQUIVALENTES DE PELE HUMANA.....	34
4.9	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICE A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.	53
	APÊNDICE B – Comprovante de submissão do artigo em inglês.....	54
	APÊNDICE C – Artigo em ingles submetido à publicação.....	55

1 INTRODUÇÃO

A partir da última década notou-se o desenvolvimento de um particular foco da ciência médica e biológica: a bioengenharia de tecidos. Através desse conhecimento é possível produzir, multiplicar e diferenciar células de diversos tecidos *in vitro*. Sob determinadas condições de estrutura e função dos tecidos originais, as células podem ser reunidas para formação de um novo tecido¹.

Devido à necessidade de suprir a demanda de enxertos de pele autólogos humanos, os quais são fundamentais para pacientes que necessitam cobertura de pele em situações particulares como queimaduras, traumas, úlceras ou seqüelas de doenças infecciosas, foram desenvolvidos substitutos biológicos equivalentes a pele humana (EPH). Os modelos ideais de EPH são apresentados como polímeros biocompatíveis e biodegradáveis com estruturas em três dimensões (3D) que podem ser produzidos tanto como moldes porosos sólidos ou hidrogéis com macro e/ou micro distribuição geométrica espacial.²⁻³

Os moldes podem ser aplicados, simultaneamente, como carreador de agentes bioativos, e como suporte para semeadura de células indiferenciadas primárias.⁴

Grupo de polímeros naturais e sintéticos tem sido comumente usado com esse objetivo. Dependendo da aplicação, os moldes podem apresentar diferentes formas, entre as quais se podem citar as membranas, e os vários tipos de moldes com arquiteturas 3-D. Nos últimos anos, vários moldes têm sido usados na engenharia de tecidos por suas características como a alta porosidade dos polímeros.^{3,5}

Membranas de quitosana e de hemi-celulose têm sido usadas como biomateriais em diferentes aplicabilidades na engenharia de tecidos. A quitosana, uma estrutura formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-desoxi-D-glucose, é derivada do exoesqueleto do camarão ou lagosta, e a membrana de hemicelulose pode ser derivada das fibras vegetais da cana-de-açúcar.^{6,7}

Em 1988, Murphy enfatizou a importância dos testes *in vitro* para o desenvolvimento de novos materiais. Segundo Schmalz, em 1994, os testes *in vitro* de citotoxicidade são valiosos para a compreensão do comportamento biológico dos materiais avaliados. Embora

estes testes não possam substituir os testes em vivo, devido às suas inerentes limitações, podem diminuir substancialmente o número de testes, reduzindo a quantidade de materiais com aplicabilidade potencial clínica.^{8,9}

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA DOS TECIDOS

As células são pequenas, deformáveis e freqüentemente móveis, preenchidas por um meio aquoso e circundada por uma fina membrana plasmática. Milhões de células podem se combinar para formar estruturas maciças, fortes e extremamente ordenadas. Dessa maneira, é de vital importância a ciência dos mecanismos biológicos dos quais conferem força a esse agregado multicelular e mantém unidas as células nas suas localizações apropriadas.¹⁰

Os animais diferem na construção de seus tecidos, e cada organismo é formado de vários tipos de tecidos, nos quais as células são reunidas e ligadas de diferentes maneiras. Nos animais a matrix extracelular desempenha um papel fundamental na maioria dos tecidos. É composta por uma rede complexa de macromoléculas extracelulares com função prioritária de sustentação. A matriz extracelular também fornece um ambiente organizado no quais as células migratórias podem mover-se e interagir uma com as outras de forma ordenada. Entretanto, a sustentação dos tecidos não é mantida exclusivamente pela matriz extracelular, pois a maioria das células é ligada diretamente uma às outras por junções célula-célula.^{10,11}

Os principais tipos de tecidos são os nervos, os músculos, o sangue e os tecidos linfóide, epitelial e conjuntivo. Os tecidos conjuntivos e epiteliais representam dois extremos de organização. No tecido conjuntivo, a matriz extracelular é abundante, e as células encontram-se espaçadamente distribuídas. A matriz é rica em polímeros fibrosos, especialmente o colágeno. O estresse mecânico, ao qual o tecido esta sujeito é exercido principalmente sobre a matriz extracelular, pois as ligações diretas entre as células são raras.¹²

No tecido epitelial, as células são fortemente ligadas em camadas chamadas de epitélio. A matriz extracelular é rara e consiste, principalmente, de uma fina camada chamada de lamina basal, a qual se situa subjacente ao epitélio. As camadas de células epiteliais revestem todas as cavidades e as superfícies livres do organismo como a pele humana. As junções especializadas entre as células permitem que o epitélio forme barreiras que impedem o movimento da água, solvente e das células entre os compartimentos do organismo. O epitélio freqüentemente se localiza sobre uma camada de tecido conjuntivo. Essa combinação,

por sua vez, pode ser conectada aos outros tecidos, tais como os músculos formando grandes unidades funcionais denominadas órgãos.¹³

Muitos tecidos, como o tecido epitelial, derivam de células precursoras cuja progênie é mantida pelas ligações célula-célula e célula-matriz extracelular. Uma vez aderidas, as células mantêm sua arquitetura por adesões seletivas, essenciais no desenvolvimento dos tecidos de origens mais complexas envolvendo migração celular. Nestes tecidos, uma população de células invade outra e se ligam formando uma estrutura ordenada. O processo morfo genético de mobilidade e adesão celular direciona as células ao seu destino final. A quimiotaxia ou quimiorrepulsão, ou seja, a secreção de elementos químicos solúveis atrai ou repelem as células migratórias. Esse processo é necessário para guiar as células migratórias na matriz extracelular ou na superfície celular. Uma vez as células atinjam seu destino final, haverá o reconhecimento e a união com as outras células adequadas para formar um tecido específico. Dessa maneira, esse mecanismo é fundamental quando células de diferentes tecidos forem misturadas artificialmente para recuperarem um arranjo normal, como ocorre na cultura de tecidos.^{13, 14}

2.2 INFLUÊNCIAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular pode influenciar a organização do citoesqueleto celular. Isto pode ser demonstrado pelo uso de fibroblastos transformados em cultura. As células transformadas, frequentemente, produzem menos fibronectina do que as células normais em cultura e comportam-se de forma distinta. Essas células apresentam pouca aderência ao substrato de cultura e falham na formação ou no desenvolvimento dos feixes intracelulares de filamentos de actina.¹⁴

As proteínas da matriz, como o colágeno, a laminina e a fibronectina são reunidas em fibrilas na superfície das células que as produzem, por mecanismo dependente da actina da célula adjacente. A matriz, também pode influenciar no citoesqueleto, no espalhamento celular, assim como atuam nos receptores da superfície celular que ativam as vias intracelulares sinalizadoras.¹⁵

A ligação da célula à matriz extracelular necessita de proteínas de adesão celular transmembrana, que atuam como receptores da matriz e conectam-na com o citoesqueleto celular. As integrinas são os principais receptores usados pelas células animais para ligarem-se à matriz extracelular que, quando ativadas pela matriz, também atuam como transdutores de sinais ativando várias vias de sinalização intracelular. Essa combinação de integrinas e dos receptores podem promover o crescimento, a sobrevivência e a proliferação celular.^{15, 16}

2.3 CULTURA DE CÉLULAS

Há cerca de 100 anos foram iniciados os primeiros experimentos de cultivo de células realizados por Ross G. Harrison, na Universidade Johns Hopkins, entretanto seu foco de estudo permanece atual, e em constante desenvolvimento nas diversas áreas biológicas. Em seu breve artigo de 1907 escreveu: quando se tomam as precauções assépticas adequadas, os tecidos sobrevivem nessas condições por uma semana e, em alguns casos, foram mantidos espécimes vivos durante aproximadamente quatro semanas. A partir desse momento, deu-se início à ciência da cultura de células *in vitro*.¹⁷

Após alguns anos, Aléxis Carrel, na busca de prolongar o tempo de vida das células em cultura preconizou o controle de temperatura do cultivo das células (38 graus). Além disso, verificou o prolongamento do tempo de vida das células ocorrido com a troca do meio de cultivo das células.¹⁸

Depois vieram os trabalhos de George Gray com cultivo de células tumorais (linhagem HeLa). Seguido de estudos clássicos de Hayflick e Moorhead sobre o uso do cultivo para linhagens celulares humanas.^{19,20}

Células normais apresentam em um padrão de cultura com atividade proliferativa chamada curva de crescimento sigmoidal, a qual reflete a adaptação da cultura às condições de ambiente, da disponibilidade de substrato e dos suprimentos de nutrientes necessários para promover a produção de novas células. O comportamento e a bioquímica celular alteram significativamente a curva em cada fase; dessa maneira, o controle do estágio em que as células serão coletadas é de fundamental importância.²¹

Podem-se definir as quatro fases do crescimento celular em cultura: (i) Fase LAG, nesta fase o número de células variam pouco, pois não há proliferação imediata após a adição de células ao meio de cultura. Há pouca ou ausência de divisão celular estendendo-se de horas a dias. Células provenientes de uma fase LAG, demoram a se adaptar e iniciar seu crescimento. Nesta fase, há produção de proteínas estruturais e de enzimas, como a DNA polimerase e um aumento na síntese de DNA; (ii) Fase LOG, é a fase de crescimento logarítmico com máximo crescimento. Há maior viabilidade e atividade metabólica, sendo o período ideal para experimentação e estudo. A duração dessa fase depende da densidade inicial das células, da taxa de crescimento celular e da densidade de saturação da linhagem; (iii) Fase PLATEAU, caracterizada por grande formação de células acompanhadas pela redução da velocidade de crescimento. O número de células mortas tende a ser equivalente ao número de células novas. Pode-se atribuir ao contato célula-célula, diminuição da capacidade de dispersão, nutrientes e de fatores de crescimento; (iv) Fase de MORTE CELULAR, onde há grande redução do número de células que suplantam a quantidade de células vivas.^{21,22}

A curva de crescimento é também importante para a manutenção de rotina e para quantificar o número de células no futuro, sendo as células de linhagens celulares contínuas cultivadas na concentração de 1×10^5 a 1×10^6 células/ml, dependendo do tipo de linhagem celular.^{21,22}

Os experimentos com cultura de tecidos tiveram início no princípio do século. Nesta época o meio de cultura era extraído de fontes naturais, como linfa e coágulos de plasma. Obviamente, a composição extremamente variável desses meios impedia a realização de dois experimentos nas mesmas condições. Esta limitação, aliada à importância intrínseca de se identificar todos os componentes do meio de cultura necessários à sobrevivência e ao crescimento para cada tipo de célula, despertou o interesse precoce de se estabelecer um meio quimicamente definido. Somente na década de 50 é que se conseguiu formular o primeiro meio quimicamente definido, constituído por sais, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e fatores séricos, através de estudos como o de Eagle, em 1955. Esse meio era incapaz de garantir por si só o crescimento celular, sendo necessário, a presença de fatores séricos. Nesta época, acreditava-se que o soro era necessário para fornecer algum tipo de nutriente. Posteriormente, descobriu-se que a função do soro no meio de cultura era fornecer fatores de crescimento e não nutrientes. Esses últimos são fornecidos pela parte quimicamente definida do meio de cultura.²²

Inicialmente, a busca do estabelecimento de quais os componentes do soro necessários à sobrevivência e crescimento de cada tipo de célula era feita através de tentativas de análise bioquímica dos componentes ativos isolados diretamente do soro. Esse tipo de estudo foi muito difícil e não produziu resultados práticos importantes. A dificuldade foi devida principalmente à complexidade e as baixas concentrações de cada hormônio presente no soro associado ao fato de que muito destes fatores se ligam aos carregadores perdendo sua atividade quando dissociados e também ao sinergismo apresentado pelos diferentes fatores. A substituição de um enfoque analítico por um enfoque sintético permitiu a realização de progresso significativo nesta área. Assim, em 1976, Sato e Hayashi mostraram ser possível a manutenção de células em meio de cultura sem soro, por diversas gerações. Neste experimento a presença do soro foi necessária antes e depois da tripsinização da cultura para o repique.²³

Posteriormente, Orly e Sato ao adicionarem ao meio de cultura uma mistura de hormônios e certa quantidade de fibronectina tornaram possível a sobrevivência de diversos tipos de células em total ausência de soro.²⁴

Carrel, em 1913, publica trabalho sobre o cultivo de células no tratamento de feridas, sugerindo que o crescimento artificial de células *in vitro* poderia acelerar a taxa de regeneração dos tecidos.²⁵ A partir desse momento, foram realizados vários estudos com o cultivo de células, visando a interferência sinérgica na regeneração dos tecidos.²⁵

Brayle, em 2001 mostrou uma série de dezoito pacientes portadores de grandes queimaduras tratados com cultivo de queratinócitos.²⁶

Martin, em 2003, cultivou fibroblastos derivados de biópsia dérmica para o tratamento de úlcera venosa da perna, publicado noventa anos após o trabalho precursor de Carrel, mostrando a contínua busca no desenvolvimento de métodos laboratoriais *in vitro* com potenciais para aplicabilidade clínica.²⁷

2.4 EQUIVALENTES DE PELE HUMANA (EPH)

A reconstrução de Equivalentes de Pele Humana (EPHs) como uma alternativa da experimentação animal oferece não somente uma maneira de atender as exigências de autoridades reguladoras, de organizações de proteção dos animais, consumidores e cientistas, mas também de aperfeiçoar e estender nosso conhecimento sobre os processos biológicos na pele. Recentemente, várias reconstruções de pele estão disponíveis compondo somente o compartimento epidérmico ou de ambos os compartimentos epidérmico e dérmico.²⁸

Em cada compartimento, vários tipos de células podem ser incorporados, incluindo queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans na epiderme, e fibroblastos e células endoteliais no compartimento dérmico.²⁹

Hoje os EPHs mostram-se adequados para testes de toxicidade de pele *in vitro* possibilitando grandes avanços nessa área. Também, os EPHs podem oferecer um bom modelo para estudo de base da biologia da pele, reparação de feridas, regulação da melanogênese, e da patogênese de afecções e cânceres de pele.³⁰

No desenvolvimento dos EPHs, grandes avanços têm ocorrido orientados pela necessidade de tratamento de lesões que exijam cobertura de pele. Na área da bioengenharia dos tecidos, equivalentes epidérmicos podem cobrir queimaduras profundas num período máximo de três semanas, onde surgem como alternativas para os enxertos autólogos, os quais muitas vezes apresentam sérias limitações em relação à disponibilidade de áreas doadoras. Os EPHs devem ser concebidos com características da pele normal e serem imunologicamente tolerados.³⁰

Novas tecnologias são necessárias para a otimização de culturas de células de pele em terceira dimensão (3D) aumentando o espectro terapêutico na área da bioengenharia dos tecidos. Em 1998 o Apligraf[®], derivado do colágeno bovino tipo 1, foi o primeiro EPH aprovado pelo FDA, sendo recomendado preferencialmente para cobertura de úlceras venosas refratárias ou agudas e para áreas doadoras de enxertos de pele parcial.³¹

A partir daquele momento, surgiram vários outros produtos destinados à cicatrização das feridas. Também em 1998, indicando grande interesse da indústria farmacêutica, a

Genévriet Laboratories inaugurou um novo departamento dedicado a produção de cultura de células como agentes terapêuticos, e foi quando produziu o Epibase[®], um EPH composto de cultura de queratinócitos.³²

Fundamental é o esforço para a produção de tecidos cultivados com o máximo de reprodutibilidade e qualidade, e sempre atento para a viabilização econômica, onde o custo final deve estar adequado ao meio sócio-econômico onde estará inserido. No Brasil, país com sérias limitações sócio-econômicas, esse fator torna-se de fundamental importância no desenvolvimento do potencial de uso desta tecnologia.³³

A construção bem sucedida de um EPH envolve a combinação de uma estrutura que contenha endoderma, mesoderma e ectoderma, o qual também deverá ser funcional, possuir tolerância imunológica e resistir ao estresse mecânico de distensão e compressão.³⁴

O uso de um determinado material com morfologia específica depende de vários fatores como: indução, condução, angiogênese, proliferação celular e degradação no caso de moldes temporários em terceira dimensão (3D).^{34, 35}

Hearly e colaboradores, relataram um experimento com matriz densa de colágeno na concentração de 5 e 40 mg/mL com cultura de fibroblastos. As três variáveis preditoras foram: migração celular, densidade celular e expressão de metaloproteinases. Esse estudo mostrou que, após 21 dias em cultura, na matriz hidratada de colágeno, a concentração de fibroblastos era similar à densidade de fibroblastos da derme humana, entre 2.000 e 4.000 células/mm³. Também foi evidenciado que os fibroblastos, após 28 dias de cultura, atingiam uma distância de 320 µm com 5.500 células/mm³ quando cultivados em uma matriz com uma concentração de colágeno de 40 mg/mL.³⁶

Várias combinações foram produzidas *in vitro*, as quais mimetizam o tecido original e geralmente proporcionam crescimento diferenciado de culturas de queratócitos sobre substratos dérmicos ou acelulares recobertos por fibroblastos, assim como derme despidermizada, matrizes de colágeno, filtros inertes e membranas de colágeno-GAG liofilizadas com ligação cruzadas por agentes químicos.³⁷

2.5 ESTRATO CÓRNEO (EC): CORRELAÇÃO COM O EQUIVALENTE DE PELE HUMANA EPIDÉRMICO (EPHe)

A barreira da permeabilidade consiste de múltiplas lamelas lipídicas que preenchem o espaço extracelular entre células queratinizadas do estrato córneo. O estrato córneo é constituído por uma membrana de proteína de cerca de 15 µm de espessura e é secretada pela membrana plasmática durante o final a diferenciação celular. A resistência da penetração no estrato córneo depende de um envelope córneo impermeável. É constituída por vários precursores que estabelecem ligação cruzadas. A análise detalhada da composição das proteínas do estrato córneo da epiderme original e reconstruída revela grande similaridade. As proteínas do estrato córneo estão entrelaçadas formando um plano rígido, químico-resistente, e insolúvel. A camada superficial do estrato córneo é rígida e formada por 80% do envelope córneo, onde a penetração ocorre entre os queratócitos. O envelope lipídico corneocítico está situado externamente ao estrato córneo, e é composto por hidroxiceramides-hidroxiácidos e ácidos graxos livres. O envelope lipídico corneolítico tem importante papel na orientação da lamela lipídica entre os queratócitos que estão orientados paralelamente à superfície córnea. Essas configurações biológicas também têm sido encontradas na epiderme reconstruída in vitro. Os EPHe têm por objetivo manter a sustentação e a impermeabilização com o intuito de simular as características encontradas no estrato córneo da epiderme.³⁸

A partir de publicações como de Gallassi et al., a bioengenharia de tecidos vem desenvolvendo equivalentes de pele humana (EPHs) em ambos os compartimentos da pele, sendo os mesmos utilizados em combinações em moldes de terceira dimensão (3D) bi-laminado, numa tentativa de produzir um modelo substituto da pele que seja o mais funcional possível, estável, e seguro.²⁹

Os EPHe podem ser encontrados como uma rede de nylon entrelaçada com uma pequena quantidade de polipeptídeos, os quais aderem firmemente sobre a superfície cruenta da ferida. O Biobrane[®] é um produto disponível e aprovado pelo FDA, mostrando muita efetividade quando bem indicado, porém seu custo representa um fator limitante diante da realidade sócio-econômica do Brasil.^{33,39}

2.6 EQUIVALENTE DE PELE HUMANA EPIDÉRMICO (EPHe) COMPOSTO DE PELÍCULA DE QUITOSANA : BIOPIEL[®]

Segundo Cardenas e colaboradores, as películas de acetato de quitosana, representado pelo Biopiel[®], são preparadas usando quitosana originadas de camarões (*Pleuroncodes monodon*) de baixo e alto peso molecular (LMW = 68,000 g/mol e LMW = 232,000 g/mol) e graus de deacetilação de 80% e 100%, respectivamente. O produto é obtido através da adição de vários aditivos para solução de ácido acético, como: glicerol (0,5%), ácido oléico (0,05%) e ácido linoléico em proporções diferentes. A média de espessura do filme foi de 0,041 mm, entre 28 amostras mensuradas com Micrometro Digital Eletrônico. A película adquire diferentes propriedades físicas dependendo do meio ao qual está associado, na adição de glicerol à película o composto adquire elasticidade, fator importante na sua aplicação clínica.⁷

O Biopiel[®], distribuído pelo Laboratório Recalcine, é a apresentação comercial usada pelo autor, baseado nos estudos de Cárdenas e colaboradores. A película é acondicionada em envelopes selados de alumínio, e quando abertos é recomendado a previa imersão em soro fisiológico para uso clínico, com o objetivo de hidratar a película.⁷

Zhu e colaboradores, em 2005 apresentam o uso da membrana de quitosana como molde extracelular para o cultivo in vitro de fibroblastos. Os autores salientam que a quitosana não é somente um polímero não tóxico, biocompatível e biodegradável, mas também uma estrutura química similar ao glicosaminoglicanos (GAGs), os quais atuam com sinergia na cicatrização das feridas.⁴⁰

2.7 EQUIVALENTE DE PELE HUMANA EPIDÉRMICO (EPHe) COMPOSTO DE PELÍCULA DE HEMICELULOSE : VELODERM[®]

A cana de açúcar é um produto abundante de extração vegetal com baixo custo no Brasil, entretanto são expressivas as pesquisas na biotecnologia no país em busca de outras fontes naturais para o emprego como EPH. A papaína do mamão, e o óleo de copaíba são alguns exemplos de fontes naturais empregadas, já em fase de aplicabilidade clínica.^{41, 42}

O Veloderm[®] é um produto biodegradável disponível para uso no Brasil e aprovado pela ANVISA em 2004, considerado um EPH com indicação em perdas de pele de espessura parcial. Além disso, também são atribuídas as funções de auxílio na granulação e na re-epitelização. Constitui-se de um polímero de microfibras de celulose (glicosamida, N-acetilgalactosamida, aminoácidos e proteínas) obtidas mediante as culturas de *Acetobacter xylinum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pombe*. Macroscopicamente mostra-se como uma película que na microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresenta fibras entrelaçadas e é impossível de observar descontinuidade em sua superfície. A composição química polissacarídica estruturada por cadeias unidas por pontos monoméricos de glicose, configura a constituição de hemicelulose com características de translucidez, espessura, flexibilidade e densidade, quando reidratada em solução fisiológica. Há baixa solubilidade em meio aquoso, devido às trocas sistemáticas de gases e saídas de vapores aquosos.⁶

Melandri, em 2006, apresentou trabalho com o uso de Veloderm[®] em área doadora de enxertia de pele parcial, citado como um novo curativo de hemi-celulose. O Veloderm[®], segundo o autor, mostrou segurança e efetividade da re-epitelização, estabeleceu comparação, na aplicação clínica, com dois biomateriais similares: Jaloskin[®] e Algisite MTM. O autor, em 2007, apresentou um relato de caso com o uso do Veloderm[®] no tratamento das lesões de pele causadas pela Síndrome de Lyell, conhecida como uma necrose epidérmica tóxica, na qual é tratada como queimadura superficial ou enxertia parcial de pele.^{6, 43}

2.8 CITOTOXICIDADE

A chamada citotoxicidade das substâncias solúveis num determinado meio extracelular é a capacidade das mesmas influenciarem nos mecanismos de quimiotaxia ou quimiorrepulsão nas células migratórias, através da ação de agentes tóxicos como substâncias químicas ou células imunes.¹⁰

As considerações éticas e metodológicas que envolvem as pesquisas médicas têm reforçado o estudo das relações entre os experimentos *in vivo* e *in vitro*. As rígidas regras desenvolvidas pelas entidades protetoras de animais em relação ao seu uso em laboratório foram decisivas para o desenvolvimento de estudos de métodos viáveis de análise *in vitro* De

acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), o teste de citotoxicidade in vitro é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos.⁴

O estabelecimento da segurança do uso médico dos materiais é normatizado pelos documentos 10993 (ISO 10993 Technical Committee, 2007) do comitê técnico da Biological Evaluation of Medical Devices. O documento ISO 10993 está dividido em 20 partes, nas quais neste trabalho foram usadas a Parte 1, 5, e 12. A parte 1 contém as normas para a seleção dos testes, a Parte 5 contém as normas para os testes de citotoxicidade (métodos in vitro). A parte 12 contém normas para a preparação das amostras e materiais de referências.^{44, 45, 46, 47}

Normas da ISO 10993-5 definem a avaliação qualitativa da citotoxicidade de substâncias-teste, em ensaios in vitro, nas seguintes categorias:⁴⁶

- não-citotóxica (NT)
- levemente citotóxica (LT)
- moderadamente citotóxica (MT)
- severamente citotóxica (ST)

Segundo, relato de Spangberg, em 1978, testes in vitro servem para analisar a citotoxicidade prévia de determinado material e, de acordo com os achados sugerir ou não o seguimento do experimento in vivo.⁴⁸

Segundo Schmalz, em 1994, os testes de citotoxicidade são valiosos para a compreensão do comportamento biológico dos materiais avaliados, considerando-se as limitações destes testes durante a interpretação dos resultados, e que não irão substituir os testes in vivo, porém poderão diminuir substancialmente o número de testes, diminuindo o número de materiais com aplicabilidade potencialmente clínica.⁴⁹

Segundo Freshney, em 2000, devido à dificuldade de monitorar os efeitos fisiológicos e sistêmicos, a maioria dos ensaios busca determinar os efeitos dos biomateriais ou drogas nas células, ou seja, a citotoxicidade. Através desses protocolos de análise, pode-se determinar se houve morte celular ou se os danos causados às células ficaram resumidos às alterações metabólicas Na União Européia, está determinado que qualquer medicamento ou biomaterial

com potencial para o uso clínico deva ser submetido a uma avaliação biológica prévia antes da sua inclusão no mercado europeu.⁵⁰

O objetivo dos testes de biocompatibilidade é estimular a reação biológica de tecidos biológicos quando em contato a determinados materiais. Esses métodos representam à racionalização nos estudos de bioengenharia. Favorecem tanto uma redução de custos, reduzindo a ocorrência de surpresas nos testes clínicos e estudos in vivo. Sem os testes laboratoriais prévios, a utilização de animais pode ser mais dispendiosa e consumir mais tempo de experimentação.⁴⁹

2.9 TESTES IN VITRO

A engenharia de tecidos necessita desenvolver um melhor polímero como molde, que entre outras qualidades devem ser biodegradáveis e biocompatíveis.⁵¹

Segundo a ISO, a seleção e avaliação de qualquer material ou dispositivo com pretensão de uso em humanos requer um programa estruturado de avaliação. Esta avaliação deve ser planejada e realizada por peritos com conhecimento e experiência suficientes para poder tomar decisões sobre as vantagens e desvantagens dos vários materiais e procedimentos de testes disponíveis. Para a seleção apropriada dos testes iniciais de avaliação para cada dispositivo e/ou material e seu tempo de contato, a ISO contém um guia de testes.⁴⁵

Os ensaios in vitro são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade. Citotoxicidade significa causar efeito tóxico no nível celular. Entre os efeitos tóxicos, pode ser citada a morte celular, alterações na permeabilidade da membrana, ou a inibição enzimática. A alta biocompatibilidade é uma importante propriedade dos implantes, e seus métodos de análise, na engenharia de tecidos, são realizados através de implantes in vivo ou em culturas de células in vitro. A necessidade de estudos do comportamento celular in vitro sobre a superfície de diferentes materiais é fundamental para o uso racional e seguro na prática médica. No método in vitro podem ser observados os processos de crescimento celular diretamente sobre os biomateriais. Características de adequada permeação e excelente adesividade celular são importantes fatores na avaliação de biomateriais. As propriedades físico-químicas dos biomateriais, tanto

do aspecto químico ou morfológico, causam efeitos na adesão, na distribuição, na proliferação, na diferenciação e na função celular.⁵²

A biocompatibilidade é a capacidade de um material de exercer sua função, na aplicação específica, na presença da resposta específica do hospedeiro. A citotoxicidade pode ser considerada como um fator adverso a uma resposta adequada do hospedeiro, ou seja, a não compatibilidade de um material.⁵³

Materiais usados para fabricação de biomateriais não são determinados somente por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, e estabilidade mecânica; mas, também como sinalizadores de processos de diferenciação celular que estimulem a formação tecidual.⁵⁴

Os testes *in vitro* são realizados utilizando linhagens celulares permanentes ou culturas primárias (por exemplo, fibroblastos da pele). Alguns autores afirmam que as culturas primárias refletiriam de forma mais precisa as situações *in vivo*, entretanto apresentam dificuldades no cultivo. Outros, afirmam que o uso de linhagens celulares estabelecidas oferece vantagens no cultivo, pois a definição das condições de cultura evita variações individuais e a interferência de complexas interações que ocorre *in vivo*.⁵⁵

O Comitê Europeu para Padronização (CEN) é um órgão competente que avalia e recomenda normas para a utilização de materiais biológicos. Sugerem a utilização de métodos *in vitro* padronizados como forma de minimizar as necessidades de avaliações *in vivo*.⁵⁶

As linhagens celulares usadas para cultura em estudos *in vitro* são adquiridas de linhagem estabelecidas e fornecidas por bancos celulares ou de tecidos, como a American Type Tissue Culture Collection (ATCC).⁵⁷

A citotoxicidade de um biomaterial pode ser investigada usando diferentes tipos de células pelo ensaio de MTT, o qual mensura a atividade mitocondrial de células vivas e representa um parâmetro de suas atividade metabólica. Dessa maneira, podem ser usadas como células originadas de cultura primária, como no trabalho de Zhu e colaboradores em 2005, ou como linhagen celular usado, em 2007, por Tang e colaboradores.^{58, 59}

O ensaio de MTT é um teste laboratorial e um ensaio colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular. Também pode ser usado para a citotoxicidade de um potencial agente medicamentoso ou de outros materiais tóxicos.⁵⁹

A viabilidade celular pode ser avaliada por vários métodos; entretanto é aconselhável um processo que utilize um menor variabilidade e tempo na análise das amostras.⁶⁰

O sal MTT de coloração amarela (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) é reduzido na mitocôndria das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A densidade óptica (OD) resultante do Teste MTT é determinada em espectrofotômetro.⁶¹

A citotoxicidade pode ser comparada entre diferentes biomateriais, como os derivados da quitosana, celulose, colágeno, látex ou ácido hialurônico. Os resultados são extraídos do contato direto de células cultivadas sobre superfície das películas, ou as células cultivadas e expostas ao meio de extração (ME) dos biomateriais testados. A viabilidade celular é expressa como uma percentagem de células vivas do material testado versus a percentagem de células do controle positivo de citotoxicidade.^{7, 62- 65}

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar in vitro a citotoxicidade de equivalentes de pele humana

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar a citotoxicidade do Biopiel[®] e Veloderm[®] no cultivo de fibroblastos da linhagem celular NIH-3T3, através do teste de MTT por 24, 48, e 72 horas, conforme classificação e normas da ISO 10993.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo Analítico, experimental, in vitro e controlado. Foi realizado através da análise da citotoxicidade de extratos de equivalentes de pele humana (Veloderm e Biopiel) em culturas in vitro de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 através do teste colorimétrico de MTT com a presença de grupos controle.

O trabalho proposto foi realizado no Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

4.2 EQUIVALENTES DE PELE HUMANA

Para este estudo foram utilizados como EPH os seguintes produtos:

- VELODERM[®]: película de hemicelulose fornecido pela Natek Indústria e Tecnologia, Natureza e Comércio de Produtos Biotecnológicos Ltda.

- BIOPIEL[®]: película de quitosana fornecido pelo Hospital Naval de Talcahuano “Almirante Andriazola”, Talcahuano, Chile. Desenvolvida na Universidade de Concepción e a Universidade Austral do Chile. Distribuída pela Empresa CFR Corporación Farmacéutica Recalcine.

4.3 CULTURA CELULAR

Fibroblastos da linhagem NIH-3T3 de *Rattus norvegicus* foram obtidas da American Type Culture Collection - ATCC n° CRL-1658™ (Rockville, MD) e cultivadas em meio DMEM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL) em estufa de a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

O meio de cultura foi substituído a cada três dias e as passagens foram realizadas sempre que as células atingiam 70% de confluência. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Azul de Trypan e após a contagem as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços para a realização do teste de colorimétrico de MTT para determinação da citotoxicidade do biomaterial Veloderm® e Biopiel®.

4.4 MEIO DE EXTRAÇÃO DO BIOMATERIAL

Amostras de cada biomaterial-teste (Veloderm® / Biopiel®) foram imersas no meio de cultura (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino. A proporção da área da superfície da amostra para o volume de meio foi de 3 cm²/mL, de acordo com ISO 10993/5, conforme Tabela 1. A área da superfície foi calculada com base na dimensão total da amostra, desconsiderando a porosidade. Conforme preconizado pelas normas da ISO 10993, os extratos permaneceram durante 24 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Tabela 1 – Classificação da taxa de extração de materiais para testes de citotoxicidade de acordo com a espessura e o tipo do material segundo normas da ISO 10993/5 ⁴⁶

<i>Espessura (mm)</i>	<i>Taxa de Extração ± 10%</i>	<i>Exemplos de Materiais de Extração</i>
≤ 0.5	6 cm ² /mL	Metal, polímero sintético, cerâmico, filmes
> 0.5	3 cm ² /mL	Metal, polímero sintético, cerâmico
≤ 1.0	3 cm ² /mL	elastômero natural
>1.0	1.25 cm ² /mL	elastômero natural
Irregular	0.1–0.2 g/mL, 6 cm ² /mL	Grânulos

4.5 CULTURAS PARA AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Quatuplicatas contendo 0,5 mL por poço de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 na concentração de $0,4 \times 10^5$ cel./mL foram cultivadas (A) sobre extrato de Veloderm[®], (B) sobre extrato de Biopiell[®], (C) sulfato de cobre (controle positivo de citotoxicidade) e (D) somente meio de cultura (controle negativo de citotoxicidade) em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂, conforme mostra Tabela 2. Os grupos A e B continham 10%, 60% e 100% A diluição do extrato, e 10% e 60% foi realizada em meio DMEM. No grupo C foi cultivado com 100% de sulfato de cobre e o grupo D recebeu 100% meio DMEM.

Tabela 2 – Condições de cultura nos grupos do estudo.

Grupo	Meio/Extrato	Concentrações	Citotoxicidade
VL	Veloderm [®]	10, 60 e 100 %	?
BP	Biopiel [®]	10, 60 e 100 %	?
CP	Sulfato de cobre	100%	+
CN	DMEM	100%	-

VL, BP, CP, CN = grupos em estudo; ? = pesquisado citotoxicidade; + = controle positivo de citotoxicidade; - = controle negativo de citotoxicidade.

4.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE

O método de MTT foi utilizado para a avaliação de citotoxicidade e tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT, Sigma) formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e 10% de uma solução de MTT (5mg/mL) em PBS foi adicionado a cada poço. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazan. Para a solubilização dos cristais de formazan, 100 µL de dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 570 nm, foi realizada em leitor de placas de ELISA (Bio-Rad Microplate Reader Benchmark, Inc. USA). A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle positivo de toxicidade (CP).

4.7 VIABILIDADE CELULAR EM PORCENTAGEM

Os valores de absorbância (OD 570 nm) dos Grupos estudados foram submetidos a seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{absorbância CP*} - \text{absorbância teste}}{\text{absorbância CP*}} \times 100$$

CP*: controle positivo de citotoxicidade

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS EQUIVALENTES DE PELE HUMANA

A morfologia do filme de quitosana (Biopiel[®]) e do filme de hemi-celulose (Veloderm[®]) foi obtida com Microscópio Eletrônico de Varredura Philips modelo XL30, acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) no Centro de Microscopia e Micro-Análises (CEMM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 e 20 kV. As amostras foram fixadas com fita adesiva dupla-face no porta-amostra (*stubs*) e depois de metalizadas com uma fina camada de ouro em câmara de dispersão à vácuo, usando baixa taxa de deposição.

4.9 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As comparações entre os grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student (2 grupos) ou ANOVA (oneway) (4 grupos) seguido pelo teste Tukey quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a citotoxicidade em fibroblastos NIH 3T3 cultivados em exposição aos extratos dos EPH Biopiel® e Veloderm®, em diferentes concentrações por 24, 48, 72 horas.

A Tabela 3 apresenta um resumo dos dados neste estudo. A citotoxicidade das células cultivadas em extratos de ambos os EPHs puro (100%) revelou uma diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controle de positivo de citotoxicidade (CP).

Tabela 3 – Comparação do efeito das diferentes concentrações dos EPHs na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 cultivadas em diferentes períodos de tempo.

Tempo de Exposição	Concentração	VL n = 4	BP n = 4	CN n = 4	CP n = 4	P
24 h	10%	12,0±1,0	10,9±0,8	–	–	0,127
	60%	11,9±1,0	11,2±1,8	–	–	0,539
	100%	11,9±1,0 ^(B)	10,6±0,6 ^(B)	14,0±2,5 ^(B,C)	6,1±0,6 ^(A)	<0,001
		0,975	0,753	–	–	
48 h	10%	17,4±1,4 ^(B)	14,5±0,6 ^{(C)[I]}	–	–	0,010
	60%	16,6±1,7	16,7±1,0 ^[II]	–	–	0,884
	100%	17,7±1,4 ^(B)	17,0±1,3 ^{(B)[II]}	18,3±1,4 ^(B)	6,2±0,3 ^(A)	<0,001
		0,567	0,014	–	–	
72 h	10%	19,1±1,6 ^[I,II]	20,4±2,5	–	–	0,384
	60%	21,3±1,6 ^[II]	18,8±3,2	–	–	0,208
	100%	17,5±2,1 ^{(B)[I]}	16,6±1,4 ^(B)	17,4±5,1 ^(B)	6,2±0,4 ^(A)	<0,001
		0,041	0,143	–	–	

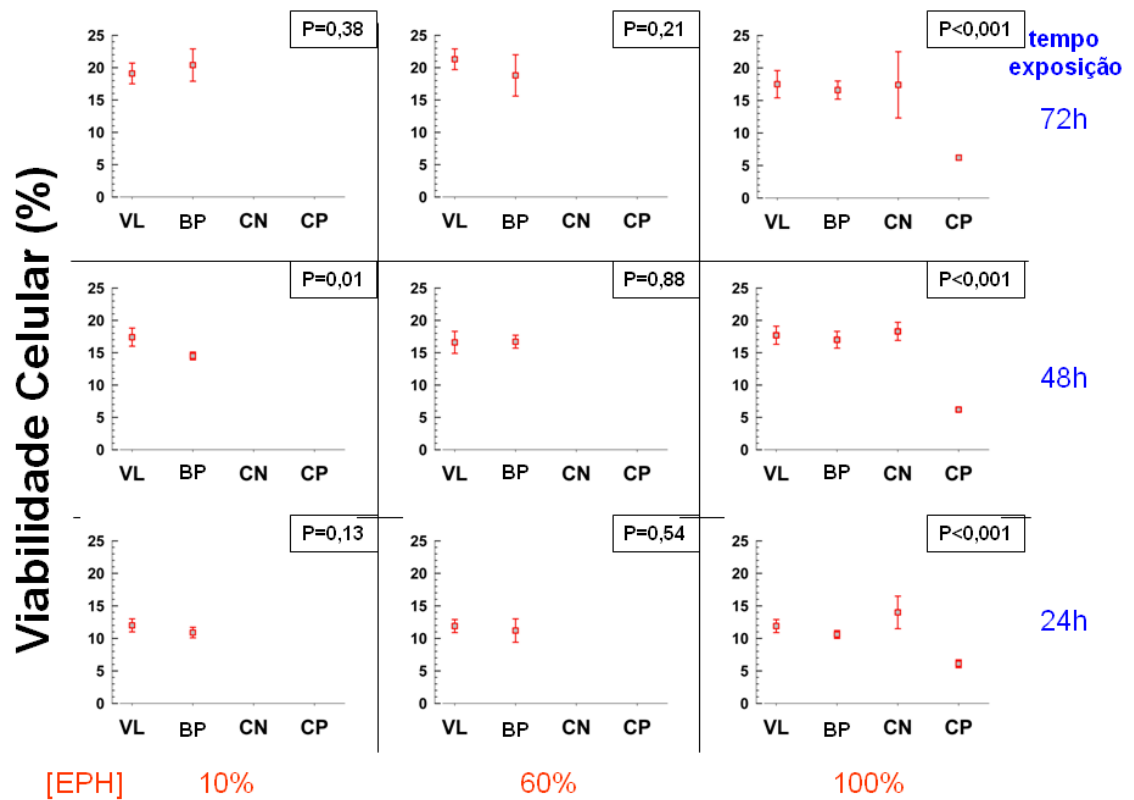
Os dados estão expressos em média±desvio padrão de absorbância em densidade ótica (OD)×100 obtidos em espectrofotômetro em 570nm. VL: Veloderm®; BP: Biopiel®; CN: controle negativo de citotoxicidade; CP: controle positivo de citotoxicidade. P: significância estatística. As comparações foram realizadas com o teste *t* de Student (2 grupos) ou ANOVA oneway (4 grupos) seguida de procedimento de Tukey, quando necessário. Letras indexadas ^(A) não-coincidentes indicam diferenças estatisticamente significativa entre os grupos. Números romanos indexados ^[I] indicam diferenças estatisticamente significativa entre as concentrações.

Os dados da Tabela 3 mostram as diferentes concentrações dos extratos dos EPH sobre o cultivo de fibroblastos da linhagem NIH – 3T3 no período de 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram expressos em densidade ótica (OD) $\times 100$, obtidas por espectrofotômetro em 570nm. Ambos os grupos (BP e VL) foram comparados com CN e CP somente na concentração de 100% de seus extratos, devido à análise sido realizada sobre EPHs previamente estabelecidos comercialmente, nas quais as concentrações de 100% representaram os EPHs em suas configurações comerciais finais.

Na comparação entre os Grupos (CN, CP, BP, VL), os dados mostraram que houve diferença significativa na citotoxicidade do Grupo CP contra CN e os Grupos BP e VL em 100% dos extratos de cultivo, nos diferentes períodos de cultivo ($p < 0,001$). Houve diferença significativa na citotoxicidade com 48 horas de período de cultivo entre o Grupo BP ($14,5 \pm 0,6$) e o Grupo VL ($17,4 \pm 1,4$), quando usados extratos de 10% ($p = 0,01$). Não houve diferença significativa na citotoxicidade do Grupo CN contra os Grupos BP e VL com 100% de extratos, independente dos períodos de cultivo.

No Grupo VL houve diferença significativa na citotoxicidade com 72 horas de período de cultivo, quando usado na concentração de 60% ($21,6 \pm 1,6$) contra a concentração de 100% ($17,5 \pm 2,1$) ($p = 0,041$).

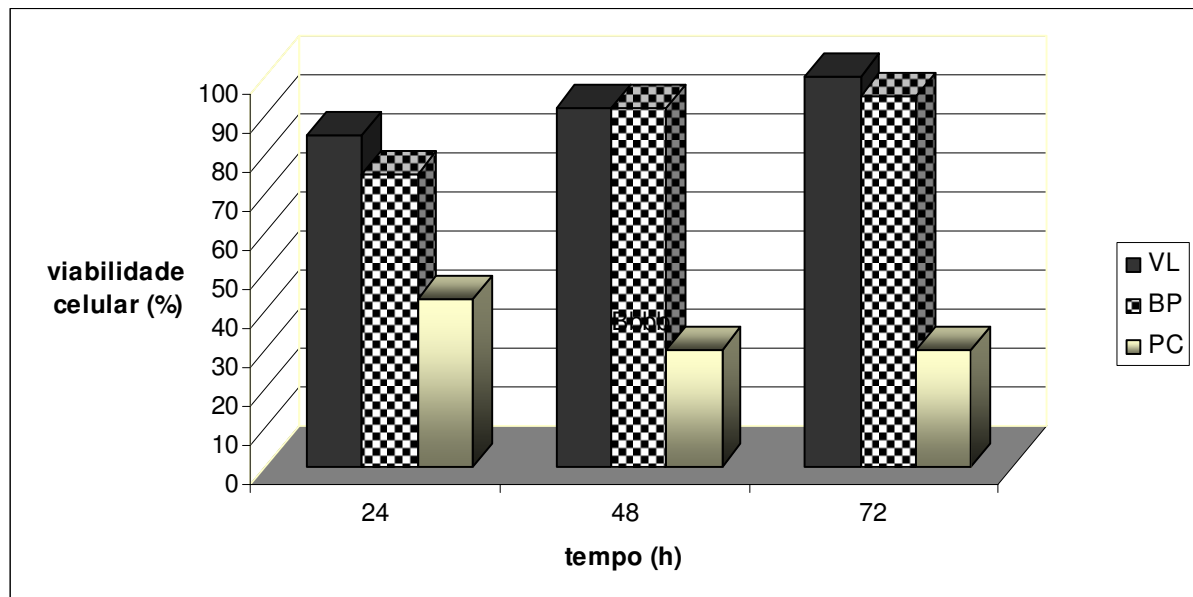
No Grupo BP houve diferença significativa na citotoxicidade com 48 horas de período de cultivo quando comparado extrato de 10% ($14,5 \pm 0,6$) contra extratos de 60% ($16,7 \pm 1,0$) e 100% ($17,0 \pm 1,3$) ($p = 0,014$).



Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de absorbância em densidade ótica (OD) \times 100 obtidos em espectrofotômetro em 570nm. VL: Veloderm[®]; BP: Biopiel[®]; CN: controle negativo de citotoxicidade; CP: controle positivo de citotoxicidade; P: significância estatística; EPH: extratos de equivalente de pele humana. As comparações foram realizadas com o teste *t* de Student (2 grupos) ou ANOVA oneway (4 grupos) seguida de procedimento de Tukey, quando necessário.

Figura 1 – Comparação de diferentes concentrações dos EPHs na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 cultivados em diferentes períodos de tempo.

A análise da Figura 1 mostrou que o aumento da concentração dos extratos dos EPHs não é acompanhado proporcionalmente pelo aumento da viabilidade celular no cultivo de fibroblastos da linhagem NIH – 3T3, com exceção no cultivo de 48 horas do Grupo BP/10% para BP/60%; entretanto não houve diferença estatística para QT/100%. Na mesma concentração do Grupo (VL e BP) houve um aumento da viabilidade celular com o aumento do tempo de exposição, com exceção dos tempos de exposição de 48 para 72 horas nas concentrações de 100% dos extratos dos Grupos BP e VL, onde foi notado pequena diminuição da viabilidade celular.



Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular com extratos de EPH e CP em relação ao controle negativo de citotoxicidade (CN), obtidos dos valores de absorvância em espectrofotômetro em 570nm. VL: Veloderm®; QT: Boppiel®; CP: controle positivo de citotoxicidade.

Figura 2 – Comparação dos extratos em 100% dos EPH e CP em relação à viabilidade celular de fibroblastos da linhagem NIH-3T3, cultivados em diferentes períodos de tempo.

Os dados da Figura 2 mostraram, na comparação dos EPH na concentração de 100% dos extratos, uma tendência de crescimento da viabilidade celular com o aumento do tempo de cultivo dos fibroblastos da linhagem NIH-3T3. Os valores da viabilidade celular dos ambos os EPHs encontraram-se entre 75% a 100%.

Os dados da Tabela 3 mostraram que os maiores valores de porcentagem da viabilidade celular na concentração de 100% do extrato do Veloderm® em relação ao Biopiel® não foi diferente estatisticamente.

Segundo Williams em 2008, a complexidade do equilíbrio entre a resposta imune e as funções regenerativas do organismo impõe dificuldades no estabelecimento dos limites da biocompatibilidade de um material. Dessa maneira, tem sido usada uma ampla bateria de testes in vitro para o auxílio da pesquisa da biocompatibilidade, segundo normas da ISO 10993. Esses testes não determinam, isoladamente, a biocompatibilidade de um material; entretanto, constitui importante etapa no seguimento para testes em animais e finalmente no uso clínico.⁶⁶

A determinação da biocompatibilidade de um material é avaliada pelo seu potencial toxicidade patogênica. A variedade de tipos e formas de materiais de uso médico resultou na caracterização e uniformidade nos testes laboratoriais.⁶⁷

Neste trabalho foi usado a escala de citotoxicidade proposto por Sletten e Dahl (1999), e Lönroth e Dahl(2001, 2003) e foram classificados os meios de extração do Biopiel[®] e Veloderm[®] segundo as normas da ISO 10993-5, diferenciados segundo níveis de viabilidade celular em porcentagens segundo Tabela 4.^{68,69,70}

Tabela 4 - Classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem segundo categorias de toxicidade dos materiais do documento ISO 10993-5: 1999.

	viabilidade celular (%) *
citotoxicidade	faixa
não-citotóxico	> 90
levemente citotóxico	80 a 89
moderadamente citotóxico	50 a 79
severamente citotóxico	< 50

* : porcentagem em relação ao controle negativo de toxicidade (CP)

De acordo com dados da Figura 2 as porcentagens de viabilidade celular dos extratos de Veloderm[®] e Biopiel[®] em 100% de concentração foram classificadas de acordo a Tabela 4 (citotoxicidade em escala) como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Classificação dos níveis estratificados de citotoxicidade dos extratos em 100% de concentração segundo normas do documento ISO 10993-5:1999, baseado nos trabalhos de Sleten e Lönroth.^{68, 69,70}

EPH na concentração de 100% do extrato	Tempo de cultivo(h)		
	24	48	72
Veloderm[®]	LT	NT	NT
Biopiel[®]	MT	NT	NT

LT: levemente tóxico; MT: moderadamente tóxico; NT: não tóxico

Conforme os resultados mostrados na Tabela 5, os extratos com concentração de 100% de Veloderm[®] e Biopiel[®] apresentaram citotoxicidade compreendida nos limites de moderadamente à não tóxicos, independente do tempo de cultivo em fibroblastos da linhagem NHI-3T3. A classificação de citotoxicidade foi determinada somente nos extratos com contração de 100%, devido o interesse do estudo em avaliar os dois biomateriais como produtos finais encontrados em suas apresentações comerciais. O Veloderm[®] apresentou classificação de LT, NT e NT nos cultivos dos extratos em 24, 48 72 horas, respectivamente. O Biopiel[®] apresentou classificação de MT, NT e NT nos cultivos dos extratos em 24, 48 e 72 horas.

Segundo Schuh, em 2008, o uso de normas da ISO é amplamente aceito para a avaliação para os materiais de uso médico. Os biomateriais podem ser analisados em seus componentes ou como um produto final segundo as normas do documento da ISO 10993. O tempo de contato é importante requisito para a realização do teste, e identificado na ISO 10993 como contato limitado (<24 horas), contato prolongado (24 horas a 30 dias) e contato permanente (>30 dias). Os testes de biocompatibilidade procuram avaliar o risco de interação entre os tecidos e os componentes ou o produto final dos biomateriais. O programa completo de testes pode incluir toxicidade geral, irritação tecidual local e avaliações pré-clínicas e clínicas.⁶⁷

No documento ISO 10993-1, como demonstra a Figura 3 são classificados os testes biológicos de avaliação inicial. Neste trabalho, os EPHs são classificados, de acordo com a ISSO 10993-1, como materiais de classe B por tempo de contato, pois os EPHs usados neste trabalho são biodegradáveis com tempo de contato superior à vinte quatro horas. Os testes

padronizados para avaliação de seus efeitos biológicos em contato com a pele são: (1) teste de citotoxicidade; (2) teste de sensibilização dérmica e/ou de mucosas; (3) teste de irritação cutânea primária, irritação cutânea cumulativa ou reatividade intracutânea.⁴⁵

ISO 10993-1			AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DISPOSITIVOS MÉDICOS							
TESTES DE AVALIAÇÃO INICIAL			EFEITOS BIOLÓGICOS (TOXICIDADES)							
CATEGORIZAÇÃO DO DISPOSITIVO MÉDICO			CITOTOXICIDADE	SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA E/OU DE MUCOSAS	IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA CUMULATIVA, OU REATIVIDADE INTRACUTÂNEA	TOXICIDADE AGUDA SISTÊMICA	TOXICIDADE SUBAGUDA E SUBCRÔNICA	GENOTOXICIDADE (TESTE AMES)	IMPLANTE	HEMOCOMPATIBILIDADE
Natureza do contato com a pessoa-usuária (veja 4.2)	Tempo de duração do contato (veja 4.3)	CLASSE POR TEMPO DE CONTATO								
CATEGORIA	CONTATO									
Dispositivo de Superfície	Pele	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X					
	Mucosas	A	X	X	X					
		B	X	X	X			X	X	
		C	X	X	X			X	X	
	Superfície Rompida ou Comprometida	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X			X	X	

Figura 3 – Segmento do documento ISO 10993-1 (demarcado em borda vermelha) no qual foram classificados ambos os EPHs avaliados neste trabalho.

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade constituem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de mamíferos. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular.⁴⁴

O teste de MTT foi escolhido, neste trabalho foi escolhido, para avaliar o percentual de viabilidade celular dos extratos de EPH testados.

O teste de MTT, segundo Bhatia é um método suficientemente rápido para avaliar um grande número de biomateriais com potencialidade no uso clínico. A escolha de fibroblastos da linhagem NHI- 3T3 foi justificada pela formação de denso tecido conetivo, assim como representarem um tipo celular pré-estabelecido no estudo da citotoxicidade dos materiais.⁶¹

Este trabalho representa etapa preliminar para uma linha de pesquisa de EPHs cultivados com células autógenas no Instituto de Pesquisa Biológica da PUCRS, projeto baseado em trabalhos como de Tonello em 2003, quando mostrou a reconstrução *in vitro* de equivalente dérmico cultivado com células endoteliais. A construção do tecido é baseado em ácido hialurônico (Hyaff-11) e enriquecido com células endoteliais oriundas de veia umbilical humana, com o objetivo de estimular a neo-vascularização do equivalente dérmico humano cultivado. A citotoxicidade do biomaterial Hyaff-11 foi avaliada pelo teste de MTT. Tonello relatou, neste trabalho, um aumento da proliferação celular e uma reorganização da rede micro-capilar no uso deste biomaterial cultivado.⁷¹

Neste trabalho, a análise dos extratos puros dos biomateriais Veloderm® e Biopiel® mostrou a não citotoxicidade, principalmente no cultivo de 72 horas segundo teste de MTT. Esses resultados sinalizam o seguimento de análises preconizadas pela ISO 10993 para a ampla verificação da biocompatibilidade, para o desenvolvimento de biomateriais cultivados e enriquecidos com células endoteliais.^{71,72}

As micrografias das superfícies do Biopiel® e Veloderm® foram obtidas por MEV conforme a Figura 4. Este trabalho não objetivou a caracterização física dos biomateriais em estudo; entretanto, foi observada nítida diferença em suas superfícies, segundo mostram a Figura 4 e Figura 5.

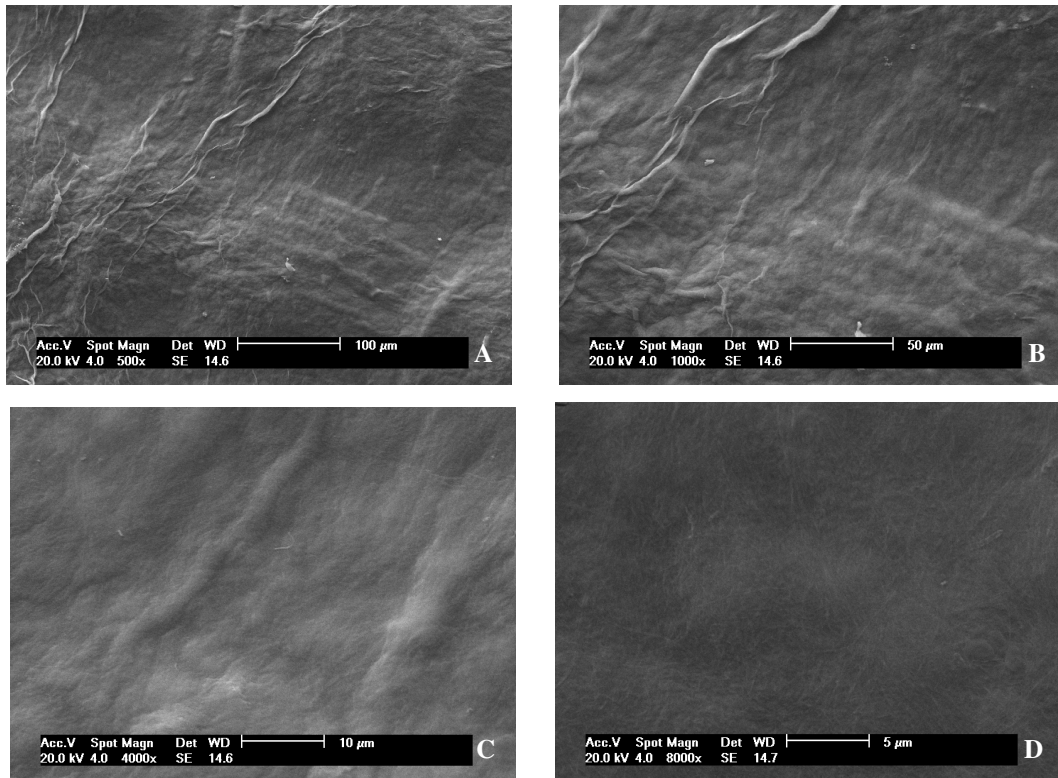


Figura 4 – Micrografias obtidas por MEV da superfície do Veloderm®.
(A) 500x; (B) 1000x; (C) 4000x; (D) 8000x.

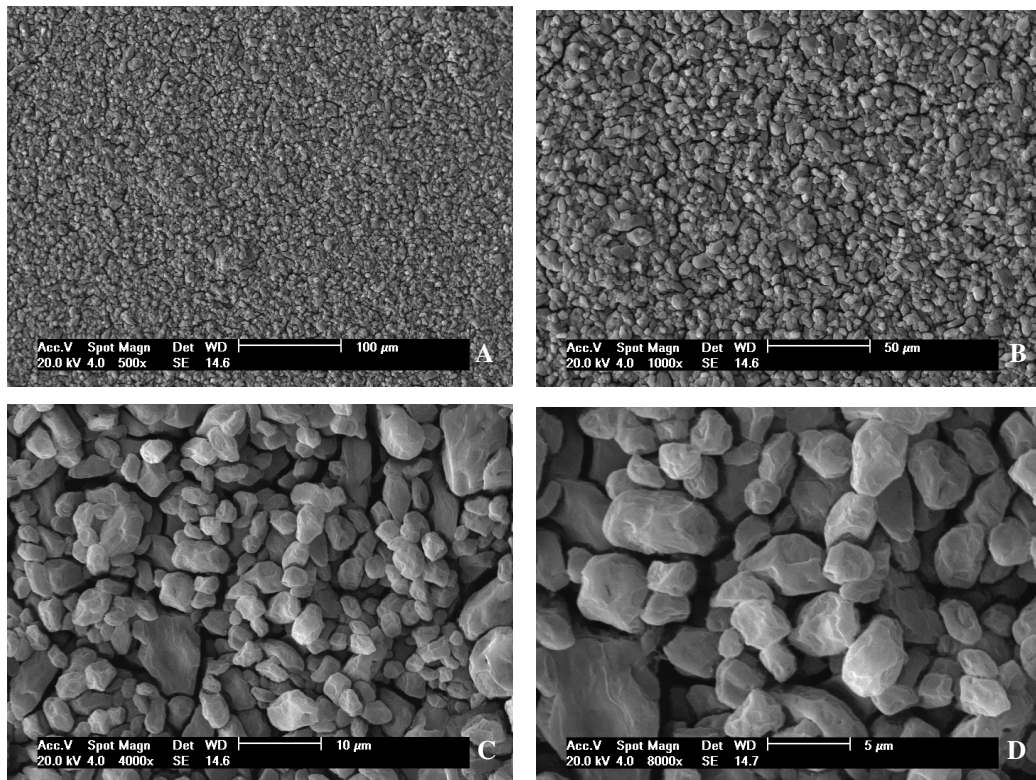


Figura 5 – Micrografias obtidas por MEV da superfície do Biopiel®.
A) 500x; B) 1000x; C) 4000x; D) 8000x.

Segundo as micrografias por MEV da Figura 4 e Figura 5, o Veloderm[®] apresenta superfície irregular, lamelar com distribuição heterogênea no tamanho das lamelas e com o aumento de 8000× não é possível distinguir descontinuidade a superfície. O Biopiel[®] apresenta superfície irregular, granulosa, com distribuição heterogênea no tamanho dos grânulos. Os resultados da viabilidade celular de ambos EPHs mostraram semelhança; entretanto apresentam caracterizações físicas nitidamente distintas.

Os substratos tridimensionais irregulares e porosos têm sido amplamente usados para suporte de cultivo de células. O tamanho e o grau de interconexão entre os poros são pré-requisitos para permitir a invasão celular e vascular, assim como a capacidade de depósitos da matrix.⁷³

O desenvolvimento da área de engenharia de tecidos, visando à cura e regeneração dos tecidos biológicos e a produção de tecidos artificiais necessitam 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 segurança e eficiência no uso dos biomateriais.⁷⁴

A superfície química do material pode definir a resposta celular ao material e, desta forma, afetar a adesão, proliferação, migração e função das células. A interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetividade de implantes médicos.^{74,75}

6 CONCLUSÃO

Não foi encontrada diferença significativa na porcentagem da viabilidade celular entre os extratos puros do Veloderm[®] e do Biopiel[®] contra o CN.

O Veloderm[®] e o Biopiel[®] sempre são diferentes estatisticamente de CP e foram classificados em seus extratos puros como não tóxicos (NT), segundo normas da ISO 10993.

O conjunto dos resultados sugere alta biocompatibilidade dos EPHs testados; entretanto, o teste colorimétrico de MTT representa uma avaliação inicial, constituindo uma importante etapa na avaliação da biocompatibilidade, pois permite a racionalização da experimentação in vivo, com diminuição de custos, e de animais nas análises obrigatórias seguintes.

REFERÊNCIAS

1. Curi R, Maldonado C. Como Cultivar Células. “In”: Borelli P. Célula Tronco. 1 ed. (Guanabara-Koogan). São Paulo; 2005: 54-8.
2. Ehrlich HP. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. *The American Journal of Surgery*.2004; 187:29-33.
3. Braye F, Hautier A, Bouez C, et al. Les substituts cutanés reconstruits en laboratoire: application au traitement des brûlés. *Skin equivalents: clinical applicatons. Pathologie Biologie*. 2005; 53: 613-17.
4. Cao Y, Croll TI, Lees JG, et al. Scaffods, Stem Cells, and Tissue Engineering: A Potent Combination! . *Australian Journal f Chemistry*.2005; 58(10): 691-703.
5. Garfein ES, Orgill DP, Pribaz JJ. Clinical applications of tissue engineered constructs.2003; 30(4): 485-98.
6. Melandri D, De Angelis A, Orioli R, et al. Use of new hemicellulose dressing (Veloderm) in treatment of split-thicknes skin graft donor sites: a withipatient controlled study. *Burns*. 2006; 32 (8):964-972.
7. Cárdenas G, Anaya P, Von Pressing C, Rojas C, Spulveda J. Chitosan composite films. Biomaterial applications. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19:2397-2405.
8. Murphy PRF. Processing at Endocytoid Material. *Adv. Cell Biol*. 1988; 2: 159-180.
9. Schmalz G. Citotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solution. *Jornal of Dental Research*. 1988; 77 (10): 1772 – 1780.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4 ed. (ArtMed). Porto Alegre; 2004; 1065-1125.
11. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R et al. Transmembrane cross-talk between extracellular matrix and cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2001; 2 (11): 793- 825.

12. Hutter H, Vogel BE, Plenefish JD et al. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science*. 2000; 287 (5455): 989 – 994.
13. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 67: 609–652.
14. Leady DJ. Implications of atomic-resolution structures for cell adhesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997; 13: 363-393.
15. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64: 403-434.
16. Schwrzbauer JE, Sech JL. Fibronectin fibrillogenesis a paradigm for estracellular matrix assembly. 1999; 11: 622-627.
17. Nancy GS. Are Research Schools Necessary? Contrasting Models of 20th Century Research at Tale Led by Ross Granvile Harrison, Grace E. Pickford and G. Evelyn Hathinson. *Journal of History of Biology*. 2003; 36: 501-529.
18. Witkowski JA. Dr. Carrel's Immortal Cells. *Medical History*. 98; 24: 129-142.
19. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 1952; 12:364-5.
20. Shay JW, Wright N. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Molecular Cell Biology*. In: *Nature Reviews*.2000; 1: 72-76.
21. Schaeffer WI. Terminology association with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro cell. Dev Biol.*1990; 26:97-101.
22. Dulbecco R, Elkington J. Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. *Nature*. 1973; 246: 197-199.
23. Hayashi E, Sato G, Hayashi I. The replacement of serum by hormones in cell culture media. *Arch Biol Med Exp*. 1976; 10: 120-1.

24. Orly J, Sato G. Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell*. 1979; 17; 295-305.
25. Carrel A. Artificial activation of the growth in vitro of connective. *J.Exp. Med.*1913; 17: 14-19.
26. Braye F, Dumortier R, Bertin-Maghit, et al. Les cultures d'épiderme pour traitement des grans brûlés. Étude sur deux ans (18 patients). *Ann Chir Plast Esthét.* 2001; 46: 599-606.
27. Martin TA, Hilton J, Jiang WG et al. Effect of human fibroblast-derived dermis on expansion of tissue from venous leg ulcers. *Wound Rep Reg.* 2003; 11:292-296.
28. Ponec M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 Suppl; 2002; 19-30.
29. Galassi G, Brun P, Radice M et. al. In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold. *Biomaterials* 21. 2000; 2183-91.
30. Benathan M, Labidi-Ubaldi F. Living epidermal and dermal substitutes for treatment of severely burned patients. *Rev Med Suisse Romande.* 1998; 118(2): 149-53.
31. Kirsner RS. The use of Apligraf in acute wounds. *J Dermatol.* 1998; 25(12): 805-11.
32. Soler C. Genéurier Biotechnology Center: production of autologous epidermal sheets (Epibase). 2002; 129 (10): 1239-41.
33. Travassos C, De Oliveira EXG, Viacava F. Geographic and social inequalities in the access to health services in Brasil: 1998 and 2003. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2006; 11(4):975-986.
34. Sun T, Mai S, Norton D, et al. Self-organization of skin cells in three-dimensional electrospun polystyrene scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; 11(7-8): 1023-33.
35. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *AM. J. Clin. Dermatol.* 2001; 2:305-313.

36. Helary C, Foucault-Bertaud A, Godeau G, et al. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials*. 2005; 26: 1533-43.
37. Yarlagadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed. Mater. Eng.* 2005; 15:159-77.
38. Ehrlich HP. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. *The American Journal of Surgery*. 2004; 187: 29-33.
39. Whitaker IS, Prowse S, Potokar TS. A critical evaluation of the use of Bibrane[®] as a biologic skin substitute: a versatile tool for the plastic and reconstructive surgeon. *Ann Plast Surg*. 2008; 60 (3): 332-7.
40. Zhu X, Chian KS, Chan-Park MBE, et al. Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. *J Biomed Mater Res B. Appl.* 2005; 73(3):264-274.
41. Cipriani FMA, Brum CI, Fortes AF et al. Management of diabetic skin wound with a natural latex biomembrane. 2004; 32(4):157-162.
42. Brito MVH, Moreira RJ, Tavares MLC, et al. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cir Brás.* 2005; 20(3): 243-246.
43. Melandri D. Lyell's syndrome skin lesions treated by Veloderm[®]. *JEADV*. 2007; 21:426-7.
44. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mat. Res.* 2003; 6(3): 317-320.
45. ISO document 10993-1:2003, Biological evaluation of medical devices, Part 1, Guidance on selection of tests.
46. ISO document 10993-5:1999, Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

47. ISO document 10993-12:2007, Biological evaluation of medical devices, Part 12, Sample preparation and reference materials.
48. Spangberg LS. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endod.* 1978; 4(10):296-9.
49. Schmalz G, Schweik H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using standard toxicant. *J Endod.* 1994; 20(12):592-4.
50. Freshney I. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biol Toxicol.* 2001; 17(4-5):213-30.
51. Trent JF, Kirsner RS. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int J Clin Pract.* 1998; 52(6): 408-13.
52. Müller U. In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical device. *Med Device Technol.* 2008; 19(2): 30, 32-4.
53. Song E, Kim SY, Chum T, et al. Collagem scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials.* 2006; 27:2951-2961.
54. Fabre T, Schappacher M, Bareille R, et al. Study of (trimethylenecarbonate-co- ϵ -caprolactone) polymer-Part 2: in vitro cytocompatibility analysis and vivo ED1 cell response of a new guide. *Biomaterials.* 2001; 22:2951-2958.
55. Freshney RI, *Biology of cultured cell. A manual of basic technique.* 2^a ed New York: Wisley-Liss, 1990, p: 147.
56. Directive 98/79/EC of The European Parliament and of The Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *OJ L337*, 7. 1998, p.1.
57. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 3 ed. New York, Wiley-Liss, 1994.
58. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Técnicas Básicas em Culturas de Células.* 4 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004; 10-12.

59. Tang LL, Liu H, Wang YL, et al. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007; 57:215-218.
60. Jayabalan M. Biological interactions: causes for risks and failures of biomaterials and devices. *J Biomater*.1993; 8:64-71.
61. Bhatia SK, Yetter AB. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. *Cell Biol Toxicol*. 2008; 24:315-319.
62. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, et al. Citotoxicidade de Polímero de Cana-de-Açúcar. *An. Fac. Méd. Univ. Fed. Pernambuco. Recife*. 2004; 49(2):119-123.
63. Klein AW. Skin filling. Collagen and other injectables of the skin. *Dermatol Clin*. 2001; 14:491-508.
64. Girotto D, Urbani S, Brun P, et al. Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials*. 2003; 24(19):3265-3275.
65. Frade MAC, Valverde RV, De Assis RVC. Chronic rhebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Inter J Dermatol*. 2001; 40:238-240.
66. Willians DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*.2008; 29(20):2941-2953
67. Schuh J. Medical Device Regulations and Testing for Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol*. 2008; 36:63-69.
68. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxicity effects of extracts of compomers. *Acta Odont Scand*. 1999; 57(6):316-22.
69. Lönroth EC, Dahl SE. Citotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odont Scand*.2001; 59(1):34-9.

70. Lönroth EC, Dahl SE. Citotoxicity of liquidas and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazoliun and neutral red tests. *Acta Scand.* 2003; 61(1):52-6.
71. Tonello C, Zavan B, Cortico et al. *Biomaterials.*2003;24:1205-1211.
72. Sahota OS, Burn JL, Brown NJ et al. Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. *Wound Rep Reg.* 2004; 12:635-642.
73. Tang ZG, Hunt JA. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Biomaterials.*2006; 27:4409-4418.
74. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell;* 84(3):359-369.
75. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.*1996; 17(2):137-146.

APÊNDICE A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-856/09

Porto Alegre, 17 de julho de 2009.

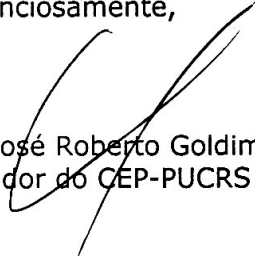
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04701 intitulado **"Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Jefferson Luis Braga da Silva
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

APÊNDICE B – Comprovante de submissão do artigo em inglês.

Gmail - Acknowledgment of New Submission to BMM, Temporary ID RANL-7TZ... Página 1 de 1



milton paulo de oliveira <miltonpaulo.poa@gmail.com>

Acknowledgment of New Submission to BMM, Temporary ID RANL-7TZLVE

1 mensagem

esubs@iop.org <esubs@iop.org>
Responder a: esubs@iop.org
Para: miltonpaulo.poa@gmail.com

16 de julho de 2009 14:26

Dear Dr. de Oliveira

Thank you for submitting your article entitled "In vitro analysis of cytotoxicity and cell proliferation of human skin equivalents"

Your files will be processed by the Electronic Submissions Team and forwarded to Biomedical Materials. This may take a few days. We will contact you if there are any problems with your files

Yours sincerely

The Electronic Submissions Team

This email (and attachments) are confidential and intended for the addressee(s) only. If you are not the intended recipient please notify the sender, delete any copies and do not take action in reliance on it. Any views expressed are the author's and do not represent those of IOP, except where specifically stated. IOP takes reasonable precautions to protect against viruses but accepts no responsibility for loss or damage arising from virus infection. For the protection of IOP's systems and staff emails are scanned automatically."

Institute of Physics Registered in England under Registration No 293851
Registered Office: 76/78 Portland Place, London W1B 1NT

APÊNDICE C – Artigo em ingles submetido à publicação.

In vitro analysis of cytotoxicity and cell proliferation of human skin equivalents

Milton Paulo de Oliveira¹, Christian Viezzer², Denise Cantarelli Machado^{2,3}, Jefferson Braga da Silva³.

¹ Graduation Course in Medical Clinic and Health Sciences, ²Biomedical Research Institute, ³Faculty of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90610000, Brazil.

E-mail: miltonpaulo.poa@gmail.com

Abstract

Evaluation of in vitro cell behavior with biomaterials may shorten the stages required to certify its compatibility. The methods proposed by ISO 10993 standards allow the ordered, and a rational scale to determine the materials biocompatibility regarding its cytotoxicity. This standardization may help to compare different biomaterials used in experimental studies, and the production of new and safe materials, contributing to the development of tissue bioengineering. Human skin equivalents frequently used may have their cytotoxicity mediated by changes in mitochondrial function, determined by MTT test. The cytotoxicity of Human Skin Equivalents (HSEs) Veloderm[®] and Biopiel[®] in NIH-3T3 cell line fibroblasts culture (4.5×10^4 cells/well) were assayed in the presence of different extracts concentrations according to the ISO 10993 standards per 24, 48 and 72 hours, and the degree of cytotoxicity was determined by the MTT test. There was a difference in cytotoxicity between VL and BP on 48 hours cell cultures when 10% extracts was used ($p=0.01$). A difference was also detected regarding BP concentrations in 48 hours cultures that shown a reduction in cytotoxicity with increasing extracts concentrations (10% to 60%) ($p=0.014$). VL extract concentrations in 72 hours cultures also shown a difference in cytotoxicity ($p=0.041$), when was detected an increase in cytotoxicity with increasing extracts concentrations (60% to 100%) ($p=0.041$). According to ISO 10993 classifications, both extracts of HSE were defined as non-toxic (NT) suggesting a high biocompatibility of Veloderm[®] and Biopiel[®]. This hypothesis should be confirmed with complementary tests, although the colorimetric MTT test is an initial evaluation to rationalize the application of biomaterials in vivo and in clinical experimentation.

Key-Words: Biomaterial, human skin substitute, human skin equivalent, biocompatibility, cytotoxicity.

Introduction

Due the demand for human autologous skin grafts, which are essential for patients who require skin in specific situations such as burns, trauma, ulcers or sequelae of infectious diseases, biological substitute equivalent to human skin (HSE) are being developed. The ideal models of HSE are presented as biocompatible and biodegradable polymers with three-dimensional (3D) structures that can be produced both as solid porous molds or hydrogels with spatial geometric macro and/or micro distribution [1, 2].

In vitro tests for the development of new materials, such the cytotoxicity tests are valuable to understand its biological behavior. Although these tests cannot replace the in vivo tests due to their inherent limitations, they can substantially diminish the number of tests, reducing the amount of materials that have potential clinical applicability [3, 4].

Biopiel[®] films are prepared using chitosan from shrimp (*Pleuroncodes monodon*) with low and high molecular weight (LMW = 68,000 g/mol and LMW = 232,000 g/mol) and degrees of deacetylation of 80% and 100%, respectively. The product is obtained by adding several additives to an acetic acid solution, such as glycerol (0.5%), oleic acid (0.05%) and linoleic acid in different proportions. The film acquires different physical properties depending on the medium with which it is associated, and the compound acquires elasticity by glycerol addition, that is an important factor for clinical application [5].

Chitosan is biocompatible and a biodegradable non-toxic polymer, but also have a chemical structure similar to the glycosaminoglycans (GAGs), which act synergistically in wound healing [6].

Epidermal human skin equivalent, Veloderm[®], is a polymer of cellulose microfibrils (glycosamide, N-acetylgalactosamide, aminoacids and proteins) obtained through cultures of *Acetobacter xylinum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *S. pombe*. Macroscopically it appears as a film that under scanning electron microscopy (SEM) presents interwoven fibers, with no discontinuity in its surface. The polysaccharide chemical composition structured by chains joined by monomeric points of glucose configures the constitution of hemicellulose with translucence, thickness, flexibility and density characteristic when it is rehydrated in saline solution. It has a low solubility in aqueous medium due to the systematic exchanges of gases and release of aqueous vapors [7].

A study using Veloderm[®] in a donor area with split skin graft shown that it is a safe and effective in reepithelization. Two similar biomaterials were compared in clinical use,

Jaloskin[®] and Algisite M[™]. Melandri, in 2007, presented a case report using Veloderm[®] to treat skin lesions caused by Lyell Syndrome, known as a toxic epidermal necrosis, in which it was successfully treated as a superficial burn or partial skin graft [7, 8, 9].

The cytotoxicity of soluble substances in a given extracellular medium is their capacity to influence the chemotaxis or chemorepulsion mechanisms of migratory cells, through the action of toxic agents, chemical substances, or immune cells [10].

The ethical and methodological considerations that involve medical research have supported the study of relations between *in vivo* and *in vitro* experiments. The strict rules developed by animal protection societies regarding their use in the laboratory were decisive for the development of feasible methods for *in vitro* analysis. According to the International Standards Organization (ISO), the *in vitro* cytotoxicity test is the first test to evaluate the biocompatibility of any material for use in biomedical devices [11]. Document ISO 10993 is divided into 20 parts, Parts 1, 5 and 12 of which were used in the present study. Part 1 contains the standards for test selection; part 5 contains the standards for cytotoxicity tests (*in vitro* methods). Part 12 contains standards to prepare the samples and reference materials [11, 12, 13, 14].

The ISO 10993-5 standards define the qualitative evaluation of cytotoxicity of *in vitro* assays, with test substances as non-cytotoxic (NT), mildly cytotoxic (MID), moderately cytotoxic (MOD), and severely cytotoxic (ST) [13].

In vitro tests are performed to analyze the previous cytotoxicity of a given material, and according to the findings, suggest or not the follow up of the *in vivo* experiment [15]. Cytotoxicity tests are valuable to understand the biological behavior of the materials evaluated, considering the limitations of these tests during the interpretation of the results, which will not replace the *in vivo* tests but may substantially diminish the number of tests, reducing the number of materials with potential clinical applicability [16].

However, according to the ISO, the selection and evaluation of any material or device intended for use in human beings requires a structured evaluation program. The purpose of ISO 10993 is to offer a structure to plan a biological evaluation. That must be planned and performed by experts who have sufficient knowledge and experience to be able to make decisions on the advantages and disadvantages of different materials and procedures available. [12].

The *in vitro* assays are usually performed as an initial screening test during the first stage of biocompatibility evaluation. The *in vitro* evaluation can supply quick and financially

accessible data regarding biological interactions, and minimize the use of experimental animals. The cytotoxicity effects are cell death, changes in membrane permeability, and enzyme inhibition. Biocompatibility is the capability of a material to function in the certain applications when there is a specific host response. High biocompatibility is a major property of implants, and methods to analyze it in tissue engineering are performed via in vivo implants or in vitro cell cultures. Studies on in vitro cell behavior on the surface of different materials are essential for its rational and safe use in medical practice. Biocytotoxicity can be considered an adverse factor to an adequate host response, i.e., the non-compatibility of a material [17].

In vitro tests with primary cultures or established cell lines are controversial [18]. The MTT assay measures the mitochondrial activity of live cells that is a parameter of its metabolic activity and can be used to evaluate primary cells or cell lines [19, 6]. It is a laboratory test and a standard colorimetric assay to measure cell proliferation [20, 21].

The yellow MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) bromide) is reduced in the mitochondria of the live cells, by the dehydrogenase succinate enzyme cleavage in purple colored formazan crystals. The continuous variable resulting from the quantity of crystals formed is directly proportional to the number of viable cells. The formazan production reflects the functional state of the respiratory chain, and the optical density can be easily determined in a spectrophotometer [22].

Cytotoxicity can be compared between different biomaterials such as the derivatives of chitosan, cellulose, collagen, latex and hyaluronic acid. The evaluation can be performed by the direct contact of cells cultured over film surfaces, or cells cultured and exposed to biomaterials the extraction medium (EM) tested. Cell viability is expressed as a percentage of live cells cultured with the tested material versus the percentage of cells of the positive control of cytotoxicity, which comprise cells culture in presence of known cytotoxic agent such as copper sulfate [5, 23, 24].

Thus, the purpose of this study was to evaluate Biopiel[®] and Veloderm[®] cytotoxicity in NIH-3T3 fibroblasts cultures by the MTT test, according to ISO 10993 classifications and standards.

Materials and Methods

Human Skin Equivalents

VELODERM[®], a hemicellulose film (Natek Indústria e Tecnologia, Natureza e Comércio de Produtos Biotecnológicos Ltda), and BIOPIEL[®], a chitosan film Navy Hospital of Talcahuano “Almirante Andriazola”, Talcahuano, Chile developed at Concepción University and at Austral Universidade of Chile) were used as a human skin equivalents (HSEs) in this study.

Cell Culture

NIH-3T3 fibroblasts cells line (American Type Culture Collection - ATCC n° CRL-1658[™] Rockville, MD) were cultured with DMEM (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) medium, supplemented with 10% bovine fetal serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 U/ml) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

The culture medium was replaced every three days and cells were split whenever reached 70% confluence. Cell viability was evaluated by Trypan Blue exclusion method, and seeded on 96-well culture plates to perform the colorimetric test of MTT.

Biomaterial Extraction Medium

Samples of each human skin equivalent, Veloderm[®] and Biopiel[®], were immersed in culture medium (DMEM) containing 10% of bovine fetal serum. The proportion of sample surface area to volume of medium was 3 cm²/mL, according to ISO 10993-5, calculated based on the total dimension, ignoring porosity, and remained in a incubator for 24 hours at 37 °C with 5% CO₂.

Cytotoxicity Evaluation

Quadruplicates containing 0.5 ml per well of NIH-3T3 at a concentration of 0.4×10^5 cel./ml were cultured with Veloderm[®] extract, Biopiel[®] extract, copper sulfate (PC=cytotoxic positive control) and only culture medium (NT=citotoxic negative control) with 5% CO₂. Human skin equivalents extracts were tested a 10%, 60% and 100% concentration. The positive control for citotoxicity was performed with 100% copper sulfate.

Cytotoxicity Test

Culture media was removed and 10% of an MTT solution (5mg/ml in PBS) was added to each well. The cultures were incubated at 37°C, sheltered from light, until the development of formazan violet crystals. To solubilize the formazan crystals, 100 µl of dimethylsulfoxide (DMSO) were added to each well and the absorbance was measured at OD 570 nm in an ELISA plate reader (Bio-Rad Microplate Reader Benchmark, Inc. USA). The percentage of dead cells was calculated considering the positive control of cytotoxicity according to the formulae: $\text{dead cells} = [(OD_{PC} - OD_T) / OD_{PC*}] \times 100$, where: PC= positive control of cytotoxicity, and T= test absorbance.

Scanning Electron Microscopy of Human Skin Equivalents

Sample of Biopiel[®] and Veloderm[®] were fixed with double-face adhesive tape in the sample holder (stubs), and then metalized with a fine layer of gold in a vacuum dispersion chamber using a low deposition rate. The HSEs morphology were obtained using the Philips Scanning Electron Microscopy model XL30, coupled to an energy dispersive spectrometer (EDS) at the of Microscopy and Microanalyses Center at the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS). The images were obtained using an acceleration voltage of 10 and 20 kV.

Statistical Methods

Comparisons between the groups were analyzed using the Student *t* tests (2 groups) or ANOVA (one-way) (4 groups) followed by the Tukey test when necessary. The differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

This study evaluated the cytotoxicity of human skin equivalents (HSEs) Biopiel® (BP) and Veloderm® (VL) at different concentrations in NIH 3T3 fibroblasts cultures during 24, 48 and 72 hours of culture.

A comparison between distinct extracts concentrations such as 10%, 60% and 100%, shown a difference in cell viability only when 10% of Veloderm® and Biopiel® were used ($p=0.01$) in 48 hours cultures. Apparently, cultures with 10% of Veloderm® extracts had 12% more viable cells than cultures with 10% of Biopiel (Table 1).

A comparison between groups (NC, PC, BP, and VL), showed that there was a significant difference in the cytotoxicity with $p<0.001$ during different periods of time of culture as follows: PC group against NC, and BP and VL against PC when 100% of crude extract was used regardless culture periods (Table 1).

When we evaluate extracts concentrations of each HSEs, a difference was detected regarding BP extracts concentrations in 48 hours cultures, that shown a reduction in cytotoxicity with increasing concentration of extract 10% to 60% ($p=0.014$). On the other hand, a difference was detected regarding VL extracts concentrations in 72 hours cultures, that shown an increase in cytotoxicity with increasing concentration of extract 60% to 100% ($p=0.041$) (Table 1).

According to ISO 10993-5 standards, the extracts of human skin equivalents evaluated in the present study, as shown in Table 2, were non toxic in 48 and 72 hours cultures. However, in a shorter period of culture (24 hours) the Veloderm® extract was classified as mildly toxic and the Biopiel® extract as moderately toxic.

The micrographs of the Biopiel® and Veloderm® surfaces were obtained by SEM, according to Figure 4. The purpose of this study was not to perform the physical characterization of the biomaterials being studied. However a clear difference between VL and BP surfaces can be observed (Figure 1 and 2, respectively) where Veloderm® shown a smoother surface that Biopiel®. Indeed, Veloderm® presents an irregular, lamellar surface, with heterogeneous distribution of lamella size, and at 8000x magnification it is not possible to distinguish surface discontinuity. On the other hand, Biopiel® presents an irregular, grainy surface with heterogeneous distribution of grain size. The results of cell viability of both HSEs showed a similarity, although they presented different physical characterizations by SEM.

Discussion and Conclusion

The MTT test, according to Bhatia is a sufficiently quick method to evaluate a large number of biomaterials with potential clinical use and the fibroblasts cultures are widely used as a cell line to study cytotoxicity. [22]

The complexity of the balance between the organisms immune response and regenerative functions makes it difficult to establish the material biocompatibility limits. Hence, a broad battery of in vitro tests has been used to help to define biocompatibility, according to the standards of ISO 10993. These tests alone did not determine the material biocompatibility. However, this is an important stage that precedes animal tests aiming clinical use [25].

In this study, the cytotoxicity scales proposed by Sletten and Dahl (1999) and Lönroth and Dahl (2002, 2003) were used, and the Biopiel® and Veloderm® extracts were classified, according to ISO 10993-5 standards, were percentages of cell viability identify non toxic, mildly toxic, moderately toxic, and severely toxic materials [26, 27, 28]. According to the results shown in Table 2, the extracts with a concentration of 100% of Veloderm® and Biopiel® presented cytotoxicity within the moderately to non-toxic limits, independent of time of culture in fibroblasts of line NHI-3T3. The cytotoxicity classification was determined only with a 100% extracts concentration due to the fact that the final products of both biomaterials commercial presentations are used as net.

According to Schuh, in 2008, the use of ISO standards is widely accepted for the evaluation of materials for medical use. The biomaterials can be analyzed in their components or as a final product according to the standards of the ISO 10993 document. Time of contact is an important requirement to perform the test, and it is identified in ISO 10993 as limited contact (<24 hours), prolonged contact (24 hours to 30 days), and permanent contact (>30 days). The present study evaluates the biocompatibility during limited and prolonged contact since cultures period of times varied between 24 to 78 hours.

Moreover, the biocompatibility tests seek to evaluate the risk of interaction between the tissues and the components or the final product of biomaterials. The complete test program can include general toxicity, local tissue irritation and preclinical and clinical evaluations [29].

The standardized tests to evaluate their biological effects are represented by the cytotoxicity test, skin sensitization test and/or mucosal sensitization test, and a set of primary skin irritation tests, cumulative skin irritation or intracutaneous reactivity [12].

Several in vitro methods, to evaluate toxicity were standardized using cell cultures. These cytotoxicity tests consist of placing the material directly or indirectly in contact with mammal cells culture, and the parameter most used to evaluate toxicity is cell viability [30].

In this study, analysis of pure extracts of Veloderm® and Biopiel® showed non-cytotoxicity, especially in the 72 hour culture. Our preliminary results point to the analyses advocated by ISO 10993 were a broad verification of their biocompatibilities should be performed, aiming their potential use as biomaterials cultured and enriched with endothelial cells [31, 32].

Regarding the Biopiel® and Veloderm® surfaces as evaluated by SEM, shows a smoother surface but apparently did not interfere with cytotoxicity and/or cell proliferation results. It is possible that further tests that will focus on cell adhesion and/or proliferation for longer periods can highlight the effects of its surfaces.

The development of tissue engineering area, aiming the cure and regeneration of biological tissues and the production of artificial tissues requires the development of new materials that are highly biocompatible. Improving culture techniques and cell analyzes in three-dimensional complex structures that form the tissues are essential. The successful application of tissue engineering, are highly dependent of the interactions between cells and putative biomaterials for its safe and efficient use [33].

A high biocompatibility of the HSEs as determined by MTT test represents an initial data, constituting an important stage in biocompatibility evaluation, since it allows rationalize in vivo experimentations, with lower costs and lower number of animal's mandatory analyses.

References

76. Ehrlich HP. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. *The American Journal of Surgery*.2004; 187:29s-33s
77. Braye F, Hautier A, Bouez C, et al. Les substituts cutanés reconstruits en laboratoire: application au traitement des brûlés. *Skin equivalents: clinical applications. Pathologie Biologie* 53. 2005; 613-17.
78. Murphy PRF. Processing at Endocytotoxicity Material. *Adv. Cell Biol.* 1988; 2: 159-180.
79. Schmalz G. Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solution. *Jornal of Dental Research.* 1988; 77 (10): 1772 – 1780.
80. Cárdenas G, Anaya P, Von Pressing C, Rojas C, Spulveda J. Chitosan composite films. *Biomaterial applications. J Mater Sci: Mater Med.* 2008; 19:2397-2405.
81. Zhu X, Chian KS, Chan-Park MBE, et al. Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. *J Biomed Mater Res B. Aplpl.* 2005;73(3):264-274.
82. Melandri D, De Angelis A, Orioli R, et al. Use of new hemicellulose dressing (Veloderm) in treatment of split-thicknes skin graft donor sites: a withpatient controlled study. *Burns.* 2006; 32 (8):964-972.
83. Melandri D. Lyell’s syndrome skin lesions treated by Veloderm®. *JEADV.* 2007; 21:426-7.
84. Yarlagadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed. Mater.Eng.* 2005;15:159-77.
85. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Biologia Molecular da Célula.* 4 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004; 1065-1125.
86. Cao Y, Croll TI, Lees JG, et al. Scaffods, Stem Cells, and Tissue Engineering: A Potent Combination! *AustralianJournal F Chemistry.*2005; 58(10): 691-703.
87. ISO document 10993-1:2003, Biological evaluation of medical devices, Part 1, Guidance on selection of tests.
13. ISO document 10993-5:1999, Biological evaluation of medical devices,Part 5, Test for cytotoxicity: in vitro methods.
14. ISO document 10993-12:2007, Biological evaluation of medical devices, Part 12, Sample preparation and reference materials

15. Spangberg LS. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endod.* 1978; 4(10):296-9.
16. Schmalz G, Schweik H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using standard toxicant. *J Endod.*1994; 20(12):592-4.
17. Song E, Kim SY, Chum T, et al. Collagem scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials.*2006; 27:2951-2961.
18. Freshney RI, *Biology of cultured cell. A manual of basic technique.* 2^a ed NewYork:Wisley-Liss,1990,p:147. Comitê Europeu para Padronização (CEN).
19. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Técnicas Básicas em Culturas de Células.* 4 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004; 10-12.
20. Tang LL, Liu H, Wang YL, et al. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2007; 57:215-218.
21. Jayabalan M. Biological interactions: causes for risks and failures of biomaterials and devices. *J Biomater.*1993; 8:64-71.
22. Bhatia SK, Yetter AB. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. *Cell Biol Toxicol.* 2008; 24:315-319.
23. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, et al. Citotoxicidade de Polímero de Cana-de-Açúcar. *An. Fac. Méd. Univ. Fed. Pernambuco. Recife.* 2004; 49(2):119-123.
24. Frade MAC, Valverde RV, De Assis RVC. Chronic phebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *International Journal of Dermatology.* 2001; 40:238-240.
25. Willians DF. On the mecchanisms of biocompatibility. *Biomaterials.*2008; 29(20):2941-2953.
26. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odont Scand.* 1999; 57(6):316-22.
27. Lönroth EC, Dahl SE. Citotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odont Scand.*2001; 59(1):34-9.
28. Lönroth EC, Dahl SE. Citotoxicity of liquids and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazoliun and neutral red tests. *Acta Scand.* 2003; 61(1):52-6.
29. Schuh J. Medical Device Regulations and Testing for Toxicologic Pathologists. *Toxicolol Pathol.* 2008; 36: 63-69.
30. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research.* 2003; 6(3): 317-320.

31. Tonello C, Zavan B, Cortico et al. *Biomaterials*.2003;24:1205-1211.
32. Sahota OS, Burn JL, Brown NJ et al. Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. *Wound Rep Reg*. 2004; 12:635-642.
33. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*; 84(3):359-369.

Table 1. Effect of different human skin equivalent extracts on cell viability in NIH-3T3 fibroblasts cultures during different periods of time.

Culture period	Concentration	VL n = 4	BP n = 4	NC n = 4	PC n = 4	P
24 h	10%	12.0±1.0	10.9±0.8	–	–	0.127
	60%	11.9±1.0	11.2±1.8	–	–	0.539
	100%	11.9±1.0 ^(B)	10.6±0.6 ^(B)	14.0±2.5 ^(B,C)	6.1±0.6 ^(A)	<0.001
		0.975	0.753	–	–	
48 h	10%	17.4±1.4 ^(B)	14.5±0.6 ^{(C)[I]}	–	–	0.010
	60%	16.6±1.7	16.7±1.0 ^[II]	–	–	0.884
	100%	17.7±1.4 ^(B)	17.0±1.3 ^{(B)[III]}	18.3±1.4 ^(B)	6.2±0.3 ^(A)	<0.001
		0.567	0.014	–	–	
72 h	10%	19.1±1.6 ^[I,II]	20.4±2.5	–	–	0.384
	60%	21.3±1.6 ^[III]	18.8±3.2	–	–	0.208
	100%	17.5±2.1 ^{(B)[I]}	16.6±1.4 ^(B)	17.4±5.1 ^(B)	6.2±0.4 ^(A)	<0.001
		0.041	0.143	–	–	

Data are shown as mean±SD of optical density (OD570nm)×100. VL: Veloderm[®]; BP: Biopiel[®]; NC: negative cytotoxicity control; PC: positive cytotoxicity control. *t* teste (2 groups) or ANOVA oneway (4 groups) followed by Tukey, when needed. Index letters ^(A) non-coincidents indicates differences between groups. Roman index numbers^[I] indicates differences between concentrations.

Table 2. Classification of the stratified levels of extract cytotoxicity in 100% concentration according to ISO 10993-5 standards [13].

HSE*	Time (h)		
	24	48	72
VELODERM [®]	MIT	NT	NT
BIOPIEL [®]	MOD	NT	NT

*Human skin equivalent. MIT= mildly toxic; MOD= moderately toxic; NT= non toxic.

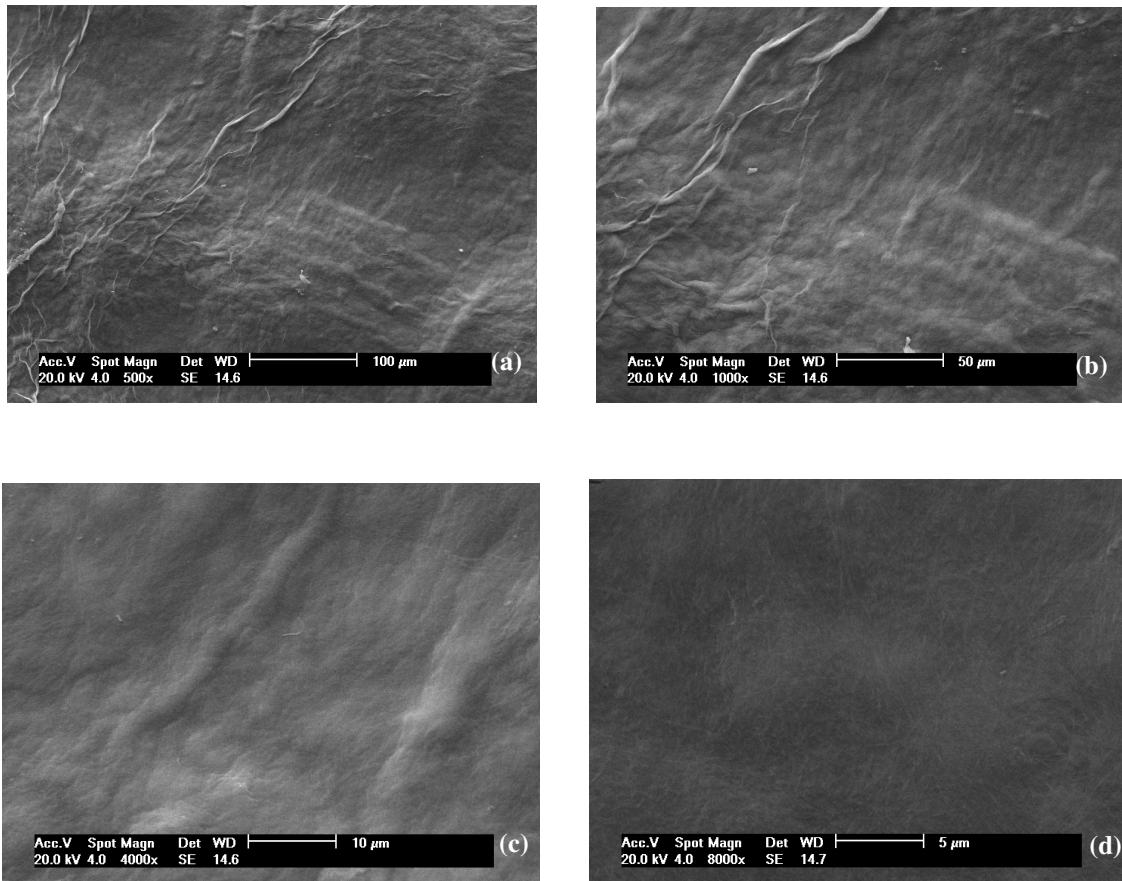


Figure 1. Micrographs of Veloderm[®] surface of obtained by SEM. (a) 500x; (b) 1000x ; (c) 4000x; (d) 8000x, magnification.

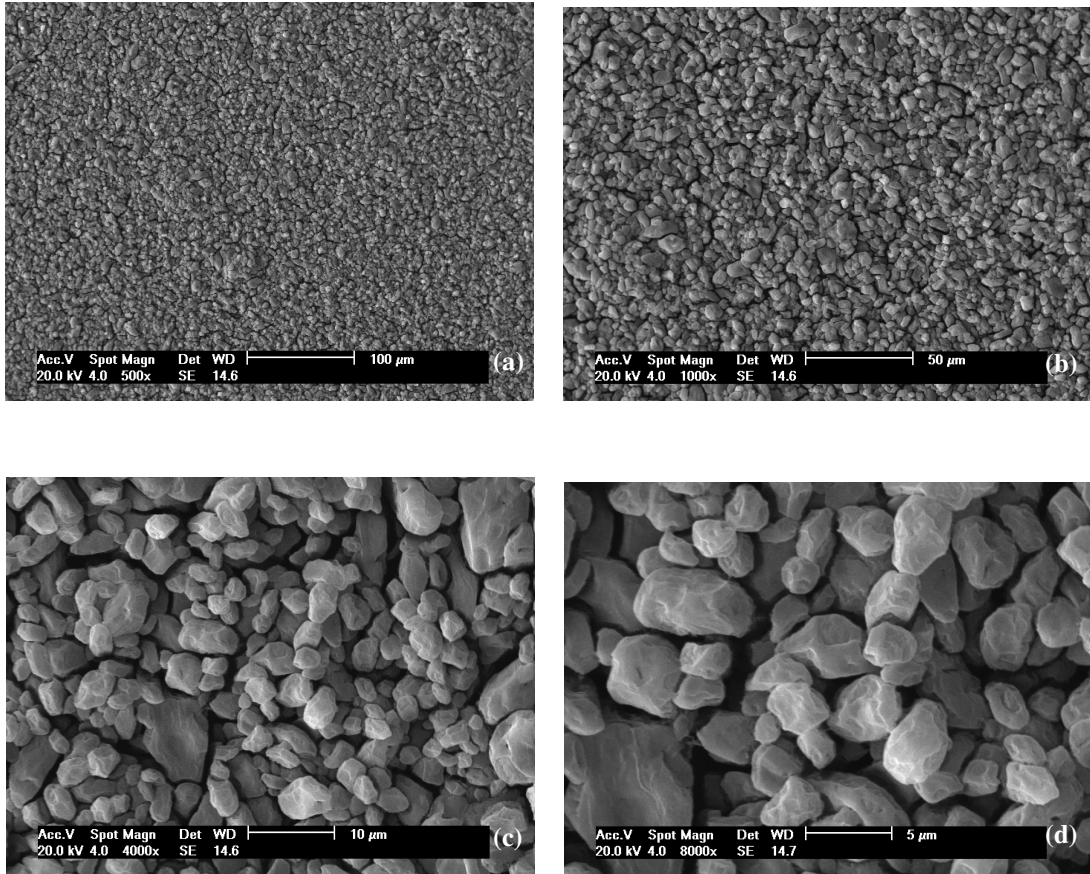


Figure 2. Micrographs of Biopiel[®] surface obtained by SEM. (a) 500x; (b) 1000x; (c) 4000x; (d) 8000x, magnification.