

Avaliação da gelatina como arcabouço para células Vero

Débora Carajiliascov Ferraraz*, Leonardo Ribeiro Rodrigues*, Christiane Bertachini Lombello*

*Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

e-mail: debora.ferraraz@ufabc.edu.br

Abstract – *The materials used as a scaffold in tissue engineering must have characteristics that are satisfactory to cell culture. Gelatin is a substance with a gelling ability and can acquire a structure favorable to cell culture. This study aims to analyze crosslinked gelatin as a scaffold for Vero cells. For the use of the gelatin as a scaffold, it was necessary to crosslink it with glutaraldehyde. The characterization of the scaffold was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), surface roughness evaluation and cellular interaction analysis. Gelatin spectroscopy evaluations did not identify alteration of the primary structure. The gelatin had a micro-roughness of $0.11 \pm 0.02 \mu\text{m}$. Analysis of the cell interaction with the scaffold found that the cells adhered and spread over the surface of the gelatin. Therefore, gelatin can be considered for the use in tissue engineering.*

Palavras-chave: Arcabouço, Engenharia de tecidos, Gelatina.

Introdução

A engenharia de tecidos tem como objetivo o desenvolvimento de tecidos para restaurar funções de partes do corpo. Na engenharia de tecidos três componentes são considerados essenciais, sendo eles: as células, que irão formar o tecido, o arcabouço, que fornecerá suporte para as células, e as moléculas sinalizadoras, que auxiliarão no processo de regeneração [1-4].

A escolha do arcabouço a ser utilizando na engenharia de tecidos é de extrema importância para o sucesso do implante. O arcabouço deve fornecer suporte tridimensional para as células, controlando o comportamento e as interações celulares [3,5].

A gelatina é obtida pela hidrólise parcial do colágeno, advindo principalmente da pele e dos ossos de suínos e bovinos. É amplamente utilizada em produtos das áreas alimentícia e farmacêutica devido à suas propriedades, em especial, a formação de gel. Sendo assim, a gelatina apresenta a capacidade de adquirir uma estrutura tridimensional que pode ser considerada para o cultivo celular [6-8].

Portanto, este estudo tem como objetivo analisar a gelatina reticulada para seu uso como arcabouço para células Vero.

Materiais e métodos

Preparo da gelatina reticulada

A gelatina em pó do tipo B (Proquimios) foi dissolvida em água Milli-Q (25% p/v), utilizando o agitador magnético digital (GO stirrer MS-H-Pro). Após a dissolução, a solução foi vertida em placa de Petri e, em seguida, a placa foi levada ao congelador, visando a gelificação.

Para reticulação, a gelatina gelificada foi imersa em solução de glutaraldeído 1% (Sigma-Aldrich), por 24 h. Posteriormente, a gelatina foi lavada diversas vezes com água destilada, para remoção do excesso do agente reticulador. A esterilização foi efetuada por autoclavagem (Stermax), a 121°C por 20 min [9-10].

Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A gelatina foi analisada com a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) [11]. A medição foi efetuada no espectrofotômetro Spectrum Two (PerkinElmer), com uma amostra de gelatina reticulada. A faixa de operação foi de 600 a 4000 cm^{-1} , com uma acumulação de 32 varreduras.

Avaliação da rugosidade superficial

A rugosidade média (Ra) e total (Rt) da gelatina reticulada foram avaliadas realizando cinco medições de áreas diferentes do arcabouço, empregando o rugosímetro Surtronic S-128 (Taylor Hobson) [12].

Análise biológica

A análise da interação das células Vero com o arcabouço foi efetuada através de imagens obtidas

por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o ensaio, as células foram inoculadas diretamente sobre a gelatina. As culturas foram mantidas por um período de três e cinco dias e a manutenção das células foi realizada com meio de cultura Ham F-10 (Sigma- Aldrich), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Como controle as células foram inoculadas sobre lamínulas de vidro seguindo as mesmas condições realizadas para o arcabouço de gelatina.

Após os períodos de incubação, as culturas foram fixadas com glutaraldeído 2,5%. Em seguida, foi executado o processo de desidratação em série alcoólica e as amostras foram submetidas à metalização com ouro (Denton Vacuum) para a observação ao microscópio eletrônico de varredura (JSM-6010LA, JEOL) [13].

Resultados

Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

O espectro FTIR da amostra de gelatina reticulada revelou uma estrutura com padrão similar de bandas ao encontrado para a gelatina em pó (Figura 1).

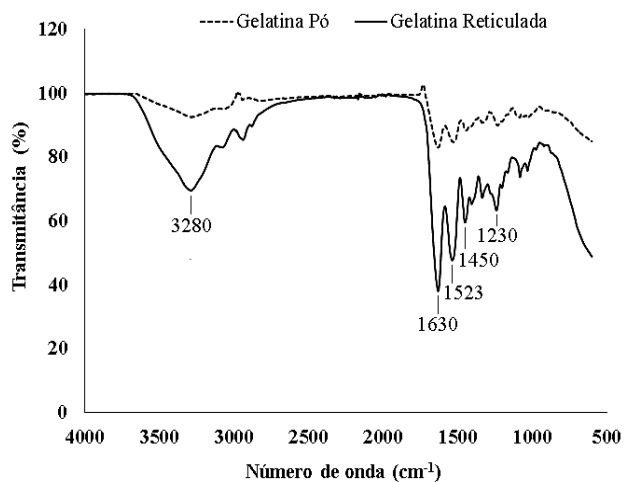


Figura 1 - Gráfico do espectro de FTIR da gelatina em pó e reticulada.

Na Tabela 1 estão apresentados os números de onda obtidos da gelatina e os valores referências encontrados na literatura, associados aos diferentes modos de vibração das ligações dos principais grupos químicos que compõem a gelatina. Além das bandas descritas, foi verificada no espectro da gelatina reticulada (Figura 1) uma banda a 1450 cm^{-1}

característica das ligações aldimina $\text{CH}=\text{N}$ (proveniente da reticulação com glutaraldeído) [11].

Tabela 1 - Números de onda do espectro da gelatina obtidos pela análise por FTIR e suas interpretações e referências.

| Número de onda (cm^{-1}) e referência | Número de onda da gelatina (cm^{-1}) | Interpretação |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 3300 [11,14,15] | 3280 | Estiramento N-H da amida A |
| 1600-1690 [11,14,16] | 1630 | Estiramento C=O da amida I |
| 1480-1575 [11,16,17] | 1523 | Estiramento C-N e flexão N-H da amida II |
| 1229-1301 [11,14,17] | 1230 | Estiramento C-N e flexão N-H da amida III |

Avaliação da rugosidade superficial

A análise da rugosidade superficial determinou que o arcabouço de gelatina apresenta micro-rugosidade ($R_a\ 0,11\pm 0,02\ \mu\text{m}$) [18]. Na Tabela 2 seguem os parâmetros obtidos da rugosidade da gelatina.

Tabela 2 - Valores das médias e desvios padrões da rugosidade superficial da gelatina, com $n=5$.

| | Média e desvio padrão (μm) |
|----------------------------|-----------------------------------------|
| Rugosidade média (R_a) | $0,11\pm 0,02$ |
| Rugosidade total (R_t) | $1,66\pm 0,34$ |

Análise biológica

As células Vero aderidas ao controle exibiam crescimento em monocamada. A morfologia era alongada e os núcleos arredondados, contendo de um a dois nucléolos (Figura 2a,b,c e d).

As células sobre a gelatina apresentavam padrão de crescimento e morfologia similar ao controle (Figuras 2e, f, g, h, i, j, k e l). Foram observadas irregularidades sobre a superfície celular e filopódios e lamelipódios.

No quinto dia de cultura, foi observada uma grande quantidade de células, formando uma monocamada em parte do arcabouço (Figura 2i, j, k e l).

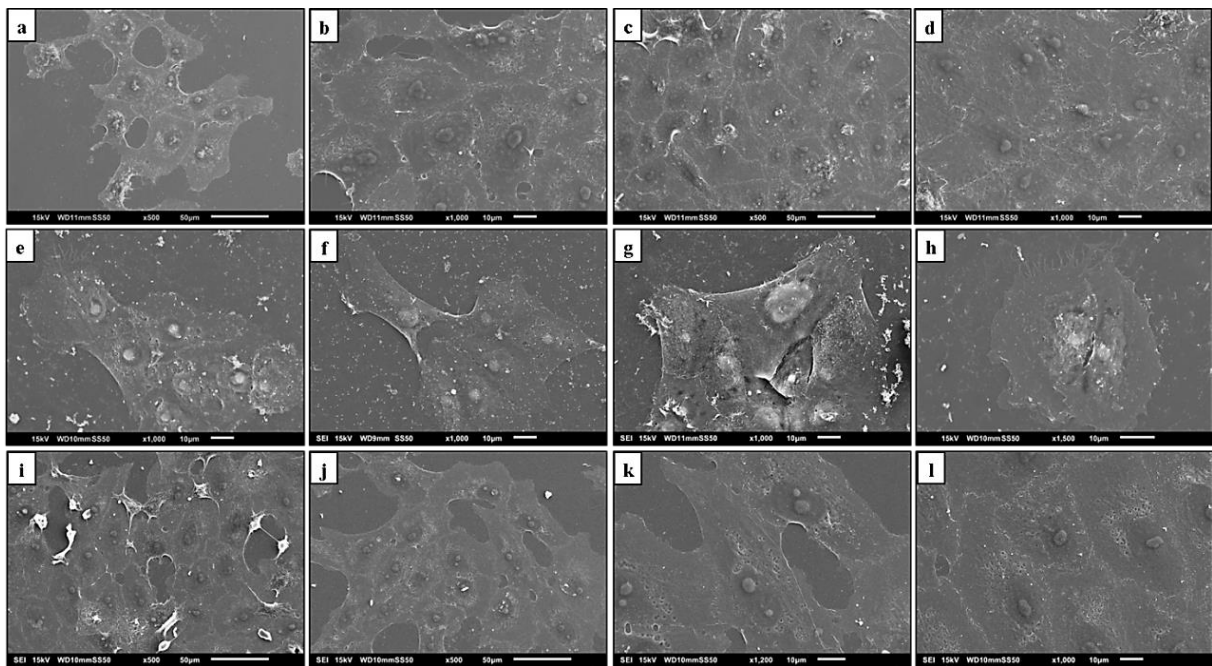


Figura 2 - Células Vero sobre o controle, com três (a e b) e cinco (c e d) dias de cultura. Células sobre a gelatina, com três (e, f, g e h) e cinco (i, j, k e l) dias de cultura. Observação por MEV.

Discussão

Os materiais utilizados como arcabouço devem apresentar características propícias ao cultivo celular. Pelo fato da gelatina apresentar ponto de fusão de aproximadamente 30°C [6], para sua utilização como arcabouço (incubação a 37°C), foi preciso realizar o processo de reticulação, para manutenção da estrutura tridimensional.

O agente reticulador empregado neste estudo foi o glutaraldeído por ser eficiente na criação de ligações cruzadas [9]. Como averiguado por Bigi *et al.* [9], a concentração de 1% do glutaraldeído apresenta a capacidade de reticulação de aproximadamente 100%. Portanto, esta concentração foi utilizada e produziu um arcabouço que se mostrou eficaz para a conservação da estrutura da gelatina após o processo de esterilização por autoclavagem e durante todo o período de cultura.

Após a reticulação foi observado que o arcabouço de gelatina adquiriu uma coloração mais escura, causada pela formação de aldíminas, provenientes das reações entre os grupos amino livres dos aminoácidos lisina ou hidroxilisina da gelatina e grupos aldeídos do glutaraldeído [11,19].

O glutaraldeído quando liberado no organismo é tóxico, podendo causar reações inflamatórias. Entretanto, estudos verificaram que a realização de lavagens do material reticulado colabora para minimizar os efeitos citotóxicos. Com isso, no presente estudo foram executadas diversas lavagens

do arcabouço de gelatina, como maneira de remover o excesso do agente reticulador [9,20].

A análise por FTIR da gelatina foi realizada para determinar se os procedimentos de reticulação e esterilização provocaram alterações em sua estrutura primária. Com a análise do espectro FTIR foi verificado que as bandas encontradas são características dos grupos químicos da gelatina [11,14-17]. Foi também encontrado no espectro a banda característica das ligações aldimina, confirmando a reticulação pelo glutaraldeído [11].

A avaliação da topografia do arcabouço de gelatina demonstrou que a rugosidade superficial pode ser considerada como micro-rugosidade, pela classificação de Vagaská *et al.* [18]. Segundo a literatura, rugosidade é um parâmetro que afeta diretamente a interação das células com os arcabouços [21].

A análise da interação das células Vero com a gelatina permitiu examinar os padrões de comportamento celular. As células aderidas a gelatina apresentavam características típicas da linhagem Vero [13], sendo semelhantes às células aderidas ao controle (lamínulas de vidro).

Foram observados que as células aderidas apresentavam filopódios e lamelipódios. Estas saliências da membrana plasmática são ricas em actina e funcionam como antenas para as células investigarem o ambiente. O alongamento destas estruturas propõe a borda das células para frente promovendo a migração celular [22]. Sendo por isso, visualizadas prevalentemente nas células que ainda

não estavam estabelecidas em monocamada. Na superfície celular foram averiguadas estruturas com aspectos de microvilosidades, evidenciando a atividade metabólica das células [23].

A gelatina apresentou características favoráveis para o uso como um arcabouço, permitindo propor a continuidade dos estudos de sua biocompatibilidade.

Conclusões

As avaliações evidenciam que a gelatina reticulada é promissora para utilização como arcabouço na engenharia de tecidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem às Centrais Multiusuários UFABC pelo apoio experimental na observação por MEV. Agradecimentos também a UFABC e Coordenação para o Melhoramento do Pessoal de Educação Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1]Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science.1993;260: p. 920-926.
- [2]Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. Eur Spine J. 2008;17: p. S467- S479.
- [3]Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun Silk Biomaterial Scaffolds for Regenerative Medicine. Adv Drug Deliv Ver; 2009;61: p. 988–1006.
- [4]O’Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials today. 2011;14: p. 88-95.
- [5]Cunha C, Panseri S, Antonini S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. Nanomedicine. 2011;7: p. 50-59.
- [6]Haug IJ, Draget KI, Smidsrød O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatina. Food Hydrocolloids. 2004;18: p. 203–213.
- [7]Karim AA, BHAT R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids. 2009;23: p. 563–576.
- [8]Gómez-Guillén, MC, *et al.* Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids. 2011;25: p. 1813-1827.
- [9]Bigi A, *et al.* Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials. 2001;22: p. 763-768.
- [10]Ulubayram, K, *et al.* Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents. J Biomater Sci Polym Ed. 2002;12: p. 1203-1219.
- [11]Nguyen TH, Lee BT. Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers J. Biomedical Science and Engineering. 2010;3: p. 1117-1124.
- [12]Grover CN, *et al.* Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. Acta Biomater. 2012;8: p. 3080-3090.
- [13]Lombello CB, Malmonge SM, Wada ML. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly (HEMA-co-AA) substrates. Cytobios. 2000;101: p.115–122.
- [14]Parikh N, Parekh K. Technique to optimize magnetic response of gelatina coated magnetic nanoparticles. J Mater Sci Mater Med. 2015;26: p.1-9.
- [15]Raja IS, Fathima NNA. A gelatin based antioxidant enriched biomaterial by grafting and saturation: towards sustained drug delivery from antioxidant matrix. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015;128: p. 537–543.
- [16]Boateng J, *et al.* Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. Int J Biol Macromol. 2015;79: p. 63–71.
- [17]Sisson K, *et al.* Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. Biomacromolecules. 2009;10: p. 1675-1680.
- [18]Vagaská, B, *et al.* Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. Physiol Res. 2010;59: p.309-322.
- [19]Oraby M A, *et al.* Electrospinning of Gelatin Functionalized with Silver Nanoparticles for Nanofiber Fabrication. Modeling and Numerical Simulation of Material Science. 2013;3: p. 95-105.
- [20]Jayakrishnan A, Jameela, S. R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. Biomaterials. 1996;17: p. 471-484.
- [21]Wirth C, *et al.* Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblastos. Materials Science and Engineering. 2005;25: p. 51–60.
- [22]Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9: p. 446-454.
- [23]Esposito AR, *et al.* Estudo da interação células Vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. Matéria (Rio J.). 2007;12: p. 164-172.