

Construção de pele humana biomimética a base de matriz de nanobiocompósito contendo fibroblastos e queratinócitos humanos

Construction of biomimetic human skin based on nanobiocomposite matrix containing human fibroblasts and keratinocytes

DAVI GLANZMANN¹
LEONARA FAYER²
MICHELE MUNK³

DOI: 10.34019/2179-3700.2024.v24.46195

ENVIADO EM: 28/11/2024

APROVADO EM: 06/10/2024

RESUMO

A pele, como principal barreira do corpo humano, é uma via importante de exposição a substâncias potencialmente tóxicas. Com o avanço da nanotecnologia, que tem se expandido rapidamente, produtos contendo nanomateriais são cada vez mais aplicados diretamente sobre a pele. Os testes de segurança e toxicidade desses produtos costumam ser feitos em culturas *in vitro* bidimensionais (2D) ou em animais; porém, devido às limitações na predição, diferenças filogenéticas e pressões ético-político-sociais, torna-se essencial a busca por métodos alternativos. Nesse contexto, modelos tridimensionais (3D) *in vitro* surgem como uma alternativa promissora, dado que podem contornar as barreiras impostas pelos outros métodos. O objetivo deste trabalho foi construir uma pele biomimética composta por matriz de nanobiocompósito à base de quitosana e nanofibras de celulose (NFC), contendo fibroblastos e queratinócitos humanos. As matrizes foram sintetizadas pelo método de *casting*, dissolvendo 1% (p/v) de quitosana de baixo peso molecular em solução de 1% (v/v) de ácido acético glacial. Posteriormente, as matrizes de quitosana foram combinadas com diferentes concentrações de NFC (0, 100 e 1000 µg/mL). Em relação à cultura celular, ambas as linhagens foram cultivadas nas matrizes utilizando meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibióticos (1% penicilina/estreptomicina), sendo mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, em atmosfera umidificada. A morfologia celular foi avaliada por microscopia de luz e o metabolismo celular por ensaio de MTT. Os resultados da microscopia mostraram alteração na morfologia das células, sugerindo um melhor aproveitamento do espaço 3D pelas células. O teste de MTT revelou uma redução na atividade mitocondrial dos fibroblastos nos tempos de 24h e 48h, e dos queratinócitos após 24h, sugerindo interferência da interação célula-matriz no metabolismo celular. No entanto, os

¹Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas pela UFJF. Estagiário na EMBRAPA Gado de Leite. E-mail: davi.glanz@gmail.com.

²Doutora e Mestre em Ciências Biológicas (PPGC BIO) com ênfase em Genética e Biotecnologia pela UFJF. E-mail: leonarafayer@gmail.com

³ Professora Adjunto do Departamento de Biologia, orientadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia, DIP/Genética e Biotecnologia) da UFJF - CNPq. Orientadora do projeto de iniciação científica. Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário Bairro São Pedro - CEP: 36036-900, Juiz de Fora/MG - Brasil. E-mail: michele.munk@ufjf.br

queratinócitos demonstraram uma maior capacidade adaptativa, retornando a níveis metabólicos similares aos do controle após 48h de exposição. As matrizes sintetizadas pelo método de Casting mostraram-se viáveis para o cultivo celular, evidenciando uma influência significativa no metabolismo das células. Os resultados indicam que essas matrizes possuem grande potencial para suportar o crescimento celular e modular as respostas celulares. Diante disso, abrem-se novas perspectivas para sua aplicação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, além de proporcionarem alternativas promissoras para testes toxicológicos *in vitro*, contribuindo para o desenvolvimento de métodos mais avançados e éticos.

Palavras-chave: Quitosana. Nanofibras de celulose. Nanotoxicologia. Cultivo celular. MTT.

ABSTRACT

The skin, as the body's primary barrier, represents a major route of exposure to potentially toxic substances. With the rapid expansion of nanotechnology, products containing nanomaterials are increasingly applied directly to the skin. Safety and toxicity testing of these products is commonly conducted in two-dimensional (2D) *in vitro* cultures or in animals. However, due to limitations in prediction, phylogenetic differences, and ethical-political pressures, the search for alternative methods has become essential. In this context, three-dimensional (3D) *in vitro* models emerge as a promising alternative, as they can overcome the barriers posed by other methods. The aim of this study was to construct a biomimetic skin composed of a nanocomposite matrix based on chitosan and cellulose nanofibers (NFC), containing human fibroblasts and keratinocytes. The matrices were synthesized by the casting method, dissolving 1% (w/v) low molecular weight chitosan in a 1% (v/v) glacial acetic acid solution. Subsequently, the chitosan matrices were combined with different concentrations of NFC (0, 100, and 1000 µg/mL). Regarding cell culture, both cell lines were grown on the matrices using DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (10%) and antibiotics (1% penicillin/streptomycin), maintained in an incubator with 5% CO₂ at 37°C in a humidified atmosphere. Cell morphology was evaluated by light microscopy, and cellular metabolism by MTT assay. Microscopy results showed changes in cell morphology, suggesting better exploitation of 3D space by the cells. The MTT test revealed a reduction in fibroblast mitochondrial activity at 24 and 48 hours, and in keratinocytes after 24 hours, suggesting that cell-matrix interaction interferes with cellular metabolism. However, keratinocytes demonstrated a greater adaptive capacity, returning to metabolic levels similar to the control after 48 hours of exposure. The matrices synthesized by the casting method proved viable for cell culture, showing a significant influence on cellular metabolism. The results indicate that these matrices have great potential to support cell growth and modulate cellular responses. Therefore, new perspectives arise for their application in tissue engineering and regenerative medicine, as well as providing promising alternatives for *in vitro* toxicological testing, contributing to the development of more advanced and ethical methods.

Keywords: Chitosan. Cellulose Nanofibers. Nanotoxicology. Cell Culture. MTT.

1 INTRODUÇÃO

A pele atua como uma barreira fundamental contra fatores externos, incluindo calor, luz, patógenos e traumas. Sua constante exposição ao ambiente a torna suscetível a influências variadas. A nanotecnologia, devido a sua rápida expansão, tem sido incorporada a produtos de cuidados pessoais, cosméticos e vestuário (Chen et al., 2019; Dubey et al., 2022). Neste contexto, a segurança e a toxicidade cutânea dos cosméticos são critérios essenciais no registro desses produtos, tradicionalmente avaliados por testes de irritação em animais. No entanto, existem limitações dessas abordagens *in vivo* devido às diferenças filogenéticas e às crescentes pressões éticas, políticas e sociais para que sejam proibidas (Chen et al., 2019; Company et al., 2020).

Devido a essas questões, modelos *in vivo* estão sendo progressivamente substituídos por sistemas tridimensionais (3D) *in vitro* em investigações toxicológicas (Fröhlich, 2018). Embora estudos com nanomateriais tenham sido conduzidos em animais e em sistemas *in vitro* 2D, seus resultados ainda são inadequados para prever a fisiologia humana (Fröhlich, 2018). Nesse sentido, abordagens *in vitro* 3D surgem como alternativas promissoras, fornecendo matrizes biomiméticas que melhoram a interação célula-célula e refletem a arquitetura 3D dos tecidos, resultando em dados mais previsíveis e reprodutíveis. A evolução das regulamentações legais impulsionou o interesse por modelos *in vitro* 3D na avaliação toxicológica de cosméticos e produtos tópicos (Company et al., 2020). No Brasil, a Resolução Normativa CONCEA nº 58 (2023) proíbe o uso de animais vertebrados em pesquisas científicas e no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, exceto quando se tratar de seres humanos, desde que os ingredientes ou compostos em questão já tenham sua segurança e eficácia comprovadas cientificamente (Art. 1º). Além disso, é obrigatório o uso de métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA em casos nos quais a segurança ou eficácia dos ingredientes não tenha sido comprovada, respeitando as competências de outros órgãos regulatórios (Art. 2º). No entanto, os modelos alternativos atuais ainda necessitam de aprimoramentos para recriar a fisiologia e o microambiente cutâneo, além de

incorporar células especializadas e metodologias de fabricação mais eficientes (Kalai Selvan et al., 2020; Mabrouk et al., 2020).

Abordagens *in vitro* 3D, utilizando matrizes poliméricas de fontes naturais biodegradáveis e biocompatíveis, são inovações para essa demanda crescente. Alguns biopolímeros usados para este propósito são a quitosana e as nanofibras de celulose (NFC). A quitosana, um polissacarídeo com propriedades físico-químicas distintas, é amplamente utilizada, mas apresenta desafios relacionados à sua baixa resistência mecânica (Wang et al., 2020). As NFC possuem propriedades mecânicas, como resistência à tração, módulo de elasticidade e baixa densidade, o que as torna promissoras para a criação de matrizes poliméricas reforçadas e com topografia 3D (Khan et al., 2020). Embora esses biopolímeros já sejam utilizados na medicina regenerativa, como no tratamento de feridas (Ackah et al., 2022), sua combinação para gerar modelos de tecido cutâneo alternativos é pouco explorada. Pelo exposto, o desenvolvimento de um modelo *in vitro* 3D de pele, de origem nacional, com elementos de baixo custo e fontes renováveis, atenderia à indústria de cosméticos e fármacos, reduzindo a dependência de modelos internacionais. A criação de uma matriz nanoestruturada de quitosana e NFC, compatível com células da epiderme e derme humanas, tem o potencial de estabelecer um novo paradigma para modelos *in vitro* 3D de pele.

2 METODOLOGIA

2.1 Síntese das matrizes poliméricas

As matrizes poliméricas de quitosana foram produzidas pelo método de Casting (evaporação do solvente). Foi dissolvido 1% (p/v) de quitosana de baixo peso molecular, com grau de desacetilação entre 75-85% (Sigma) em solução de 1% (v/v) de ácido acético glacial sob constante agitação magnética moderada. Após 24h de agitação, a solução foi transferida para placas de polipropileno, que foram mantidas em estufa por 72h a 37°C para evaporação do solvente. Logo após, as matrizes foram imersas em solução de NaOH 1M por 3h e lavadas em água destilada. As matrizes foram reticuladas pela técnica de gelificação iônica em solução de 1,3% (p/v) de tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma) por 2h a 4°C. O pH da solução de reticulação foi ajustado para 5.4 com solução de HCl 1M. Posteriormente, as matrizes foram lavadas

em água destilada e neutralizadas em NaOH 1M por 1h e, então, lavadas novamente em água destilada e secas em estufa.

Na síntese das matrizes nanocompósitas, as matrizes de quitosana foram incorporadas com as NFC. Para isso, as NFCs foram adicionadas à solução de quitosana, antes da transferência para as placas de polipropileno, e, para a dispersão do nanomaterial, foram sonicadas por 20min em banho de ultrassom (Banho de Limpeza Ultrassônica, Cristófoli, registrado pela ANVISA). As diferentes concentrações de NFCs foram obtidas a partir de dissolução seriada.

2.2 Viabilidade celular

2.2.1 Cultivo Celular

Para possibilitar o cultivo celular, os biomateriais foram esterilizados por exposição à luz UV durante 30min e, subsequentemente, submersos em uma solução de PBS 1x contendo 2% de antibiótico, composto por penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Essas matrizes foram então acondicionadas em estufa incubadora (Forma™ Series 3 Water Jacketed, Thermo Fisher (EUA)) e mantidas sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C, por um período de 24h. Após esse período, a solução foi removida e as matrizes foram submersas em meio de cultura celular DMEM (Meio Eagle Modificado de Dulbecco), enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As matrizes poliméricas foram então mantidas na estufa incubadora com uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, a uma temperatura constante de 37°C.

As células cultivadas foram fibroblastos (CCD-1072Sk) e queratinócitos humanos (ATCC® PCS-200-011™), semeadas em placas de cultura de 6 poços, na quantidade de 3×10^5 células por poço. Os grupos de cultura incluíram: (I) meio de cultura apenas, (II) matrizes de quitosana isolada e (III) nanobiocompósitos poliméricos de quitosana contendo NFC, todos em meio de cultura. As placas de cultura foram então colocadas em estufas mantidas a 5% de CO₂ e 37°C para permitir a adesão das células. O crescimento e a morfologia das células foram acompanhados ao longo do período experimental com o auxílio de um microscópio

de fase invertida (Primovert, Zeiss) equipado com uma câmera acoplada (AxionCam ERc5) para captura de imagens. Medições da área celular foram realizadas com base nas imagens obtidas, utilizando o software ImageJ.

2.2.2 Ensaio de redução do MTT

Para o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio-brometo), queratinócitos (1×10^4 célula/poço) e fibroblastos (8×10^3 célula/poço) foram adicionados em placas de 96 poços, contendo tanto o grupo de controle quanto os nanobiocompósitos com concentrações variadas de NFC (0, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). Para possibilitar a sua aderência, as células foram incubadas nessas condições por um período de 24h. Em sequência, o meio de cultivo foi removido e as células foram tratadas com uma solução de MTT (Sigma Aldrich, EUA) a uma concentração de 10% (v/v) em meio de cultura por um intervalo de 4h.

Após a incubação com MTT, o novo meio de cultivo foi descartado e, subsequentemente, as células foram expostas a uma solução de isopropanol contendo ácido (0,04 M HCl) para diluir o formazan formado, preparando-o para análise espectrofotométrica. A leitura das amostras foi realizada utilizando um espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA) a uma absorbância de 570 nm.

2.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por ANOVA (análise de variância), com as médias comparadas pelo teste Dunnett. Estes resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise foi realizada no software GraphPad Prism versão 9 (GraphPad, USA) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

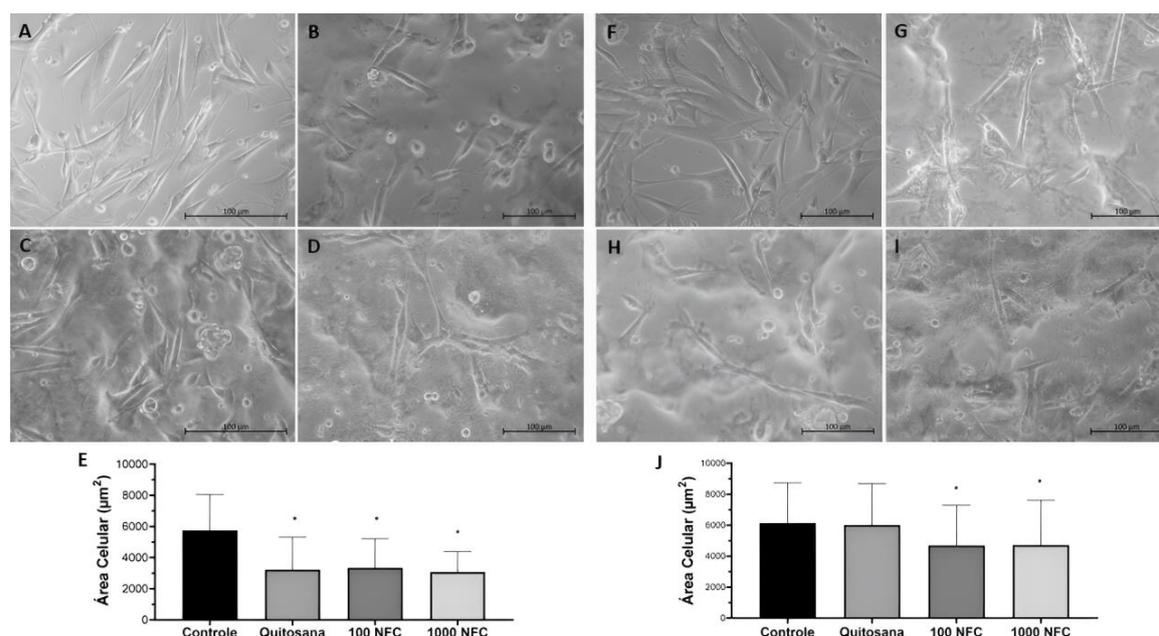
3 RESULTADOS

3.1 Cultivo celular

A análise por microscopia de luz invertida revelou a adesão das células às matrizes de quitosana e aos nanobiocompósitos, evidenciando a presença de filopódios

(conforme ilustrado na Figura 1, I). A partir das medições feitas no software ImageJ, foi possível inferir que a presença da topografia 3D nas matrizes produzidas, proporcionou uma modificação na área celular em comparação com o grupo controle (Figura 1, E e J).

Figura 1 – Imagem representativa da morfologia dos fibroblastos após cultivo in vitro por 24h (A, B, C, D) e 48h (F, G, H, I) em filme de quitosana e nanobiocompósitos com diferentes concentrações de NFC. A e F – controle; B e G – quitosana; C e H – quitosana com 100 µg/mL NFC; D e I – quitosana com 1000 µg/mL NFC. Ampliação 200x e barra de escala = 100 µm. Resultado da área celular (µm²) medida pelo software ImageJ, após 24h (E) e 48h (J) de exposição a diferentes concentrações de CNF. Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes.

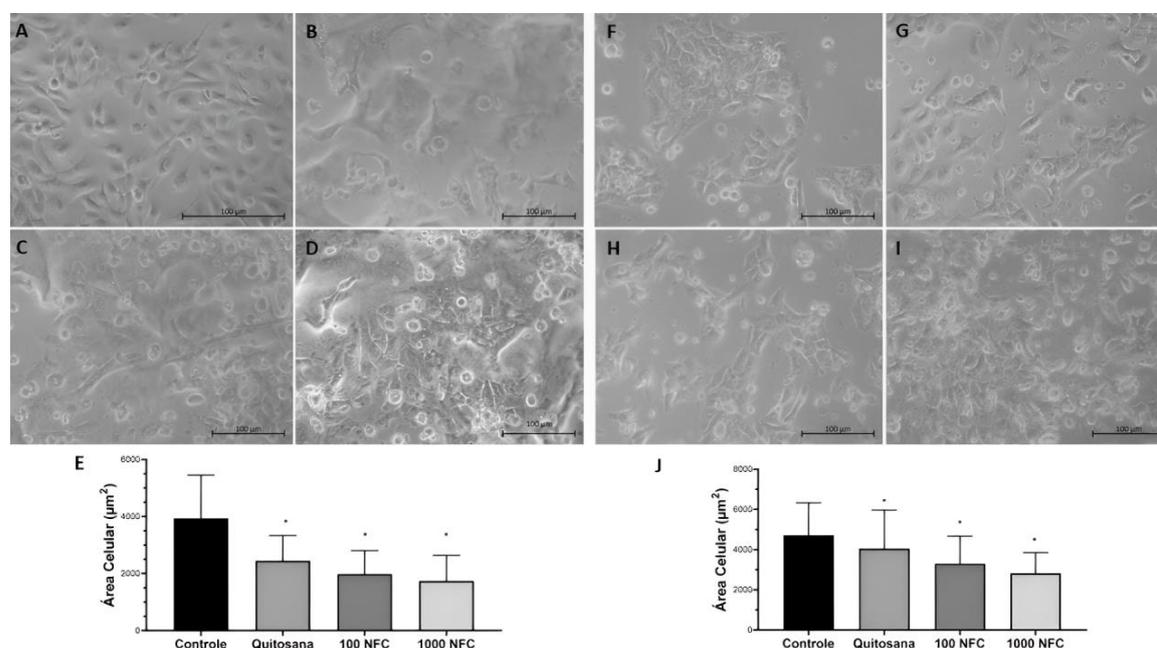


Fonte: dados da pesquisa

Durante o cultivo dos fibroblastos, foi observado que, após 24h de exposição, houve diferença significativa nos valores das áreas celulares em todos os grupos, quando contrastados com o grupo controle ($p < 0,05$). Ao completar 48h de exposição, somente os nanobiocompósitos de quitosana e NFC demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Nos queratinócitos, foram observadas diferenças na área celular tanto após 24h quanto após 48h de exposição ($p < 0,05$) nos grupos testados, em comparação com o grupo controle (conforme apresentado na Figura 2). A análise das imagens representativas capturadas por microscopia invertida

também revelou uma alteração no formato das células quando comparada ao grupo controle (Figura 2, A e E).

Figura 2 – Imagem representativa da morfologia dos queratinócitos após exposição por 24h (A, B, C, D) e 48h (F, G, H, I) em filme de quitosana e nanobiocompósitos de quitosana com diferentes concentrações de NFC. A e F – controle; B e G – quitosana; C e H – quitosana com 100 µg/mL NFC; D e I – quitosana com 1000 µg/mL NFC. Ampliação 200x e barra de escala = 100 µm. Resultado da área celular (µm²) medida pelo software ImageJ, após 24h (E) e 48h (J) de exposição a diferentes concentrações de NFC. Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes.



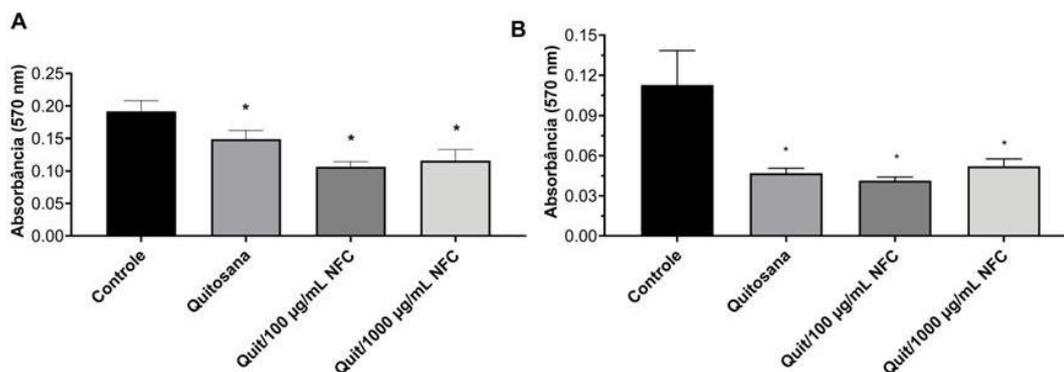
Fonte: dados da pesquisa

3.1 Ensaio de redução do MTT

A análise da atividade mitocondrial, por meio do ensaio do MTT, revelou uma diminuição nos níveis de absorvância nas culturas de fibroblastos (conforme ilustrado na Figura 3) após períodos de cultivo de 24h e 48h nas matrizes de quitosana e nos nanobiocompósitos ($p < 0,05$).

Figura 3 – Resultados do ensaio de MTT de fibroblastos para 24h (A) e 48h (B) de exposição à matriz de quitosana e aos nanobiocompósitos de quitosana e NFC

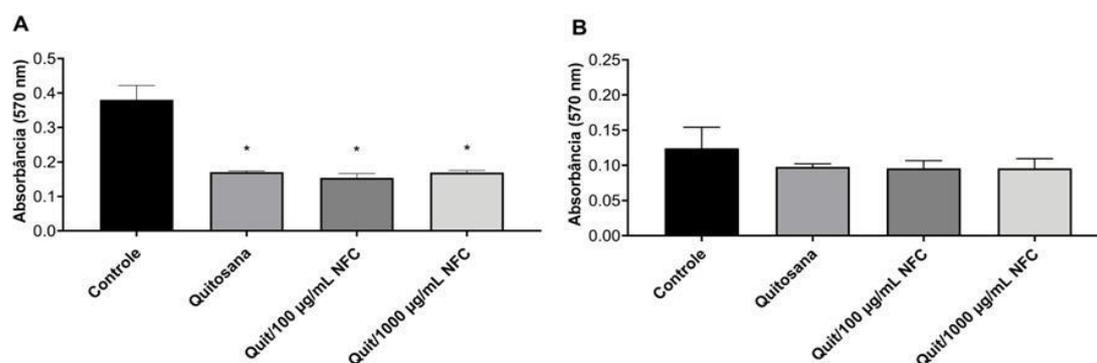
(100 e 1000 µg/mL). Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes.



Fonte: dados da pesquisa

Quando submetidos ao mesmo conjunto de condições, os queratinócitos (conforme ilustrado na Figura 4) revelaram uma diferença significativa após 24h de exposição em comparação com o grupo de controle ($p < 0,05$). Contudo, ao se estender o período de exposição para 48h aos nanobiocompósitos, as células não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo de controle ($p > 0,05$).

Figura 4 – Resultados do ensaio de MTT de queratinócitos para 24h (A) e 48h (B) de exposição à matriz de quitosana e aos nanobiocompósitos de quitosana e NFC (100 e 1000 µg/mL). Cada valor representa a média ± (SEM) de três experimentos independentes.



Fonte: dados da pesquisa

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A síntese das matrizes poliméricas de quitosana e NFC pelo método de casting, conforme descrito no protocolo, foi validada por estudos anteriores e reafirmada neste trabalho com resultados semelhantes, confirmando sua eficácia. Nas análises de cultivo celular, as avaliações microscópicas demonstraram a viabilidade de fibroblastos e queratinócitos nas matrizes desenvolvidas. Matrizes com concentrações mais elevadas de NFC (100 e 1000 µg/mL) aumentaram a área superficial e enriqueceram a topografia, proporcionando mais pontos de ancoragem para as células. Isso resultou em uma morfologia celular alterada, com menor área ocupada, enquanto células em superfícies mais lisas apresentaram maior espalhamento e menor emissão de prolongamentos, comportamento distinto do observado *in vivo*.

No ensaio de MTT, verificou-se uma diminuição significativa na atividade metabólica dos fibroblastos após 24h e 48h, sugerindo um impacto na viabilidade celular. Em contraste, os queratinócitos demonstraram uma recuperação da atividade mitocondrial após 48h, o que pode indicar uma maior capacidade de adaptação, possivelmente devido ao seu caráter epitelial. Esses resultados sugerem que as interações entre células e matrizes são complexas e influenciadas pela topografia, composição química e propriedades mecânicas das matrizes. Portanto, a seleção adequada dessas matrizes é essencial para garantir a viabilidade celular em aplicações biomédicas, especialmente para estratégias regenerativas, onde a manutenção da viabilidade celular a longo prazo é fundamental.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento CNPq PIBIC, CNPq (Processo 303148/2021-7), Fapemig (Processos APQ-01855-23 e RED00081-23) e ao Programa de Iniciação Científica (IC) da Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa (PROPP) da UFJF pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

Ackah S, Xue S, Osei R, Kweku-Amagloh F, Zong Y, Prusky D, Bi Y. **Chitosan Treatment Promotes Wound Healing of Apple by Eliciting Phenylpropanoid Pathway and Enzymatic Browning of Wounds.** *Front Microbiol.* 2022; 13:828914.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Resolução Normativa CONCEA nº 58, de 23 de fevereiro de 2023.** Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_Concea_n_58_de_23022023.html. Acesso em: 6 set. 2024.

Chen L, Wu M, Jiang S, Zhang Y, Li R, Lu Y, Liu L, Wu G, Liu Y, Xie L, Xu L. **Skin Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles in a 3D Epidermal Model Compared to 2D Keratinocytes.** *Int J Nanomedicine.* 2019; 14:9707-9719.

Company, G., Procter, T., Safety, U., Carolina, N., Sciences, B., Medicine, E., Carolina, N., Gmbh, D. E., Silicones, D., States, U., Protection, E., Carolina, N., & Commission, E. Working Group workshop. 2020; 1–23.

Dubey SK, Dey A, Singhvi G, Pandey MM, Singh V, Kesharwani P. **Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics.** *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2022; 214:112440

Fröhlich E. **Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles.** *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup2):1091-1107.

Kalai SN, Shanmugarajan TS, Uppuluri VNVA. **Hydrogel based scaffolding polymeric biomaterials: Approaches towards skin tissue regeneration.** *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020; 55: 101456.

Khan A, Wang B, Ni Y. **Chitosan-Nanocellulose Composites for Regenerative Medicine Applications.** *Curr Med Chem.* 2020;27(28):4584-4592.

Mabrouk M, Beherei HH, Das DB. **Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020; 110:110716.

Wang L, Lv H, Liu L, Zhang Q, Nakielski P, Si Y, Cao J, Li X, Pierini F, Yu J, Ding B. **Electrospun nanofiber-reinforced three-dimensional chitosan matrices: Architectural, mechanical and biological properties.** J Colloid Interface Sci. 2020; 565:416-425.