

Avaliação da proliferação de fibroblastos em meios suplementados com plasma pobre em plaquetas. Um estudo piloto

Sarah Arangurem Karam¹; Bhárbara Marinho Barcellos²; Júlio Ca²; Luiz Alexandre Chisini²; Tiano Irigaray Gonzalez²; Marcus Cristian Muniz Conde³

¹Universidade Federal de Pelotas – sarahkaram_7@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bharbarambarcellos@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cajulio125@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luizalexandrechisini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tianoiggy@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia Tecidual (ET) é um campo multidisciplinar do conhecimento, o qual alia princípios das áreas da saúde e da engenharia. Tem por objetivo regenerar tecidos e até mesmo órgãos acometidos por traumas ou patologias (LANGER; VACANTI, 1993). Para isso, baseia-se em três pilares fundamentais: as células, os fatores de crescimento e os *scaffolds* (DEMARCO et al., 2011). Dessa forma, o cultivo celular compreende um método indispensável de análise dos parâmetros de comportamento das células frente a diferentes estímulos que irão levar a proliferação e diferenciação dessas estruturas, para a constituição dos tecidos regenerados (DEMARCO et al., 2011). O meio de cultivo, utilizado para a manutenção das células *in vitro*, é universalmente suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB), composto por fatores de crescimento necessários à proliferação e manutenção da função celular (EAGLE, 1955). Entretanto, devido ao potencial de transmissão de patógenos e a dificuldade de padronização lote-a-lote, agentes xenogênicos constituem uma das principais barreiras para que as terapias baseadas no uso de células-tronco possam ser investigadas e aplicadas em âmbito clínico (MARTIN et al., 2005).

Materiais autólogos surgem como alternativa, pois nesse contexto, o paciente é a fonte provedora do material a ser utilizado (células, fatores de crescimento). Concentrados plaquetários como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), vem sendo amplamente estudado e, de fato, se mostraram aptos a substituir o SFB para cultivo de células mesenquimais (LIN et al., 2005; ISAAC et al., 2011). Entretanto, os protocolos para obtenção do PRP ainda são complexos e requerem a adição de reagentes químicos para o adequado processamento do sangue (DOHAN et al., 2006). A fibrina rica em plaquetas compreende uma nova classe de concentrados plaquetários eficiente para a regeneração tecidual sendo obtido por um protocolo de processamento simplificado, sem adição de agentes químicos exógenos ao sangue humano (DOHAN et al., 2006). Durante a centrifugação do sangue as plaquetas são ativadas e então ocorre uma liberação significativa de fatores de crescimento (TGF- β 1, IGF-I, PDGF-BB), os quais são sequestrados na rede de fibrina durante o processo de polimerização. Além disso, foi relatado que o sobrenadante, denominado Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), poderia conter uma quantidade reduzida dos fatores de crescimento acima descritos. Considerando que após a obtenção do Plasma Rico em Fibrina (PRF), o PPP é descartado, o objetivo desse estudo foi avaliar a proliferação das células mesenquimais (3T3/NIH) em meio de cultivo suplementado com Plasma Pobre em Plaquetas.

2. METODOLOGIA

O sangue humano foi obtido por doação junto ao hemocentro da cidade de Pelotas- HEMOPEL. As amostras foram manipuladas imediatamente após obtenção do sangue, sob condições estéreis e com materiais de biossegurança a fim de evitar qualquer contaminação, em uma câmara de fluxo laminar disponível no NCTBIO I. O protocolo para obtenção de plasma foi segundo CHOUKROUN et al.(2001), foi feita a centrifugação, a qual se baseia no cálculo da força gravitacional imprimida sobre as amostras (RCF ou Força $G = 1,12 \times R \times (RPM/1000)^2$), para que se obtenha uma força G resultante igual a 400. Os tubos de ensaio, contendo as amostras sanguíneas, foram centrifugados imediatamente após a obtenção, a 1.500 RPM's de frequência, em uma centrífuga de 150mm de raio durante 12 minutos em temperatura ambiente. Terminada a centrifugação, a porção correspondente ao PPP foi gentilmente pipetada e transferida para frascos criogênicos de 2ml e imediatamente congelada em ultra freezer (-80°C). Fibroblastos 3T3/NIH foram cultivados em DMEM suplementado de diferentes formas, de acordo com o grupo experimental sendo eles: DMEM:PPP (90:10; 80:20 e 70:30), DMEM:SFB-HyClone (90:10; 80:20 e 70:30), DMEM:PPP:SFB-HyClone (70:15:15) e meio controle DMEM:SFB(90:10). Um frasco de cultivo foi incubado em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂. Quando as células atingiram a subconfluência (80%), foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) removendo os metabólitos celulares. Depois disso, as células foram mantidas em uma solução de tripsina/EDTA por 5 minutos (37°C e 5% de CO₂), para destaca-las do fundo dos frascos e então a suspensão celular obtida foi dividida em tubos tipo falcon de 15ml, um para cada grupo experimental. A atividade enzimática foi inibida pela adição do dobro de volume de meio de cultivo e o conteúdo das garrafas foi centrifugado durante 5 minutos, sob a rotação de 1000 rpm, ocorrendo assim a precipitação do conteúdo celular no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 5mL de meio DMEM associado a concentração de cada amostra. Após a homogeneização, foi retirado 20µL de cada amostra para a contagem das células em Câmara de Neubauer. Após a contagem, foram semeadas 2×10^4 células por poço da placa de 96 poços (24h) (Figura 1). Após o período de incubação, o DMEM foi removido da placa e os poços lavados com PBS. Foi adicionado uma solução (Meios contendo seus respectivos suplementos) contendo 5mg/ml de MTT e mantido em contato com as células durante 4h (37°C e 5% de CO₂). Os valores médios de absorbância foram calculados, analisados através do método oneway-ANOVA e teste complementar de Tukey ($p < 0,05$), com nível de significância de 5%.

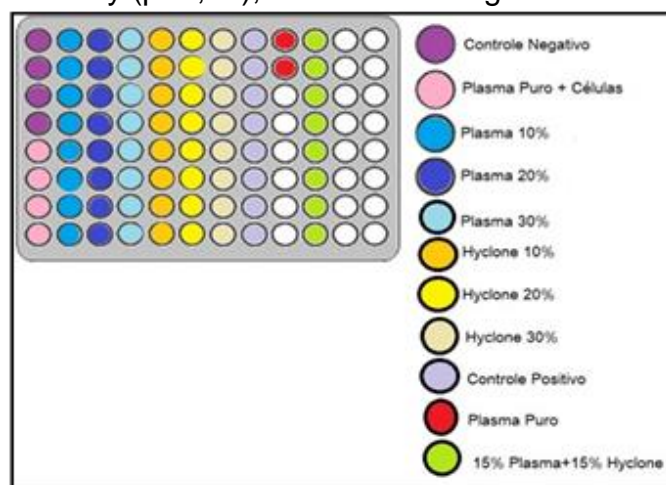


Figura 1. Demonstração da forma de divisão dos grupos na placa de 96 poços. Análise realizada em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo as análises estatísticas apresentadas (Figura 2), pudemos observar que as células cultivadas com o PPP apresentaram uma taxa de proliferação significativamente inferior aos demais grupos. Não foi observada diferença estatística entre as três concentrações de plasma aplicadas como suplemento nutricional para o cultivo celular. O PPP utilizado nesse estudo piloto, seguiu o protocolo proposto por CHOUKROUN et al. (2001). Tal protocolo foi desenvolvido com o objetivo de obter um biomaterial autólogo, capaz de suprir as necessidades de reparação e cicatrização tecidual após cirurgias. Atualmente são utilizados adesivos de fibrina comerciais, que necessitam ser ativados com trombina de origem animal. Então, esse método de isolamento do PRF visa produzir esse biomaterial que é rico em plaquetas e fibrina e que não necessita de complementação de proteínas xenogênicas para ter aplicabilidade. Dentre as causas do PPP não ter sido eficiente como suplemento, está o momento do processamento do sangue, ou seja, tanto as plaquetas, quanto os fatores de crescimento ficaram acopladas ao PRF do centrifugado, ficando assim o PPP um sobrenadante acelular e sem nutrientes necessários a manutenção das células. Em comparação aos resultados de estudos já publicados, como o de ISAAC et al. (2011), nele é descrito a ocorrência de filtragem após adição de 10% de plasma humano ao DMEM, além de ter sido usada a fração PRF como suplemento. Já no estudo de LIN et al. (2005), o meio utilizado foi DMEM-LG (DMEM+Glicose), suplementado penicilina, estreptomicina, L-glutamina, e vários derivados do sangue humano. Ao DMEM-LG foi acrescentado, além dos 10% de plasma autólogo, bFGF e EGF, 20 ng/mL de cada.

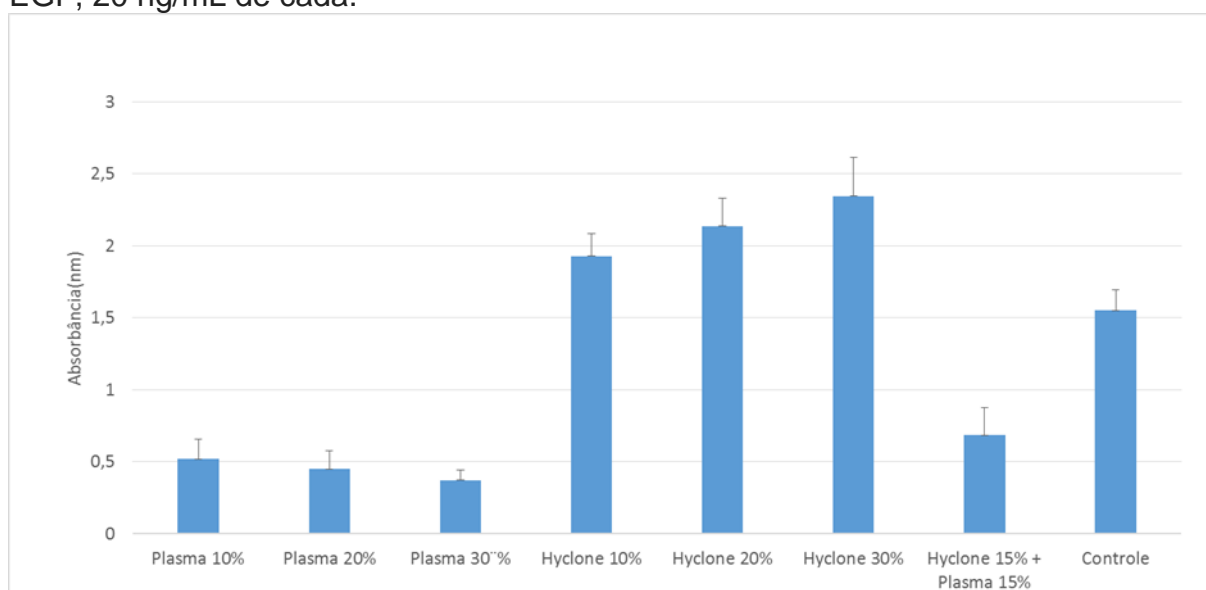


Figura 2. Gráfico de barras demonstrando a taxa de proliferação de fibroblastos em diferentes meios de suplementação.

4. CONCLUSÕES

Ao finalizar as análises, segundo nosso estudo, PPP não se mostrou eficiente como suplementação de meios para cultivo celular devido a sua capacidade de induzir a morte de células 3T3/NIH. O SFB-HyClone confirmou sua eficiência como suplementação para cultivo de células mesenquimais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOUKROUN, J.; ADDA, F.; SCHOEFFLER, C.; VERVELLE, A. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. **Implantodontie**, v.42, n., p.55-62, 2001.

DEMARCO, F.F. et al. Dental pulp tissue engineering. **Braz Dent J**, v.22, n.1, p.3-13, 2011.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrina (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.3, p.E45-50, 2006.

EAGLE, H. Nutrition need of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p.501-14, 1955.

ISAAC, C.; MATTOS, C.N.; RÊGO, F.M.P.; CARDIM, L.N.; ALTRAN, S.C.; PAGGIARO, A.O.; TUTIHASHI, R.M.C.; MATHOR, M.B.; FERREIRA, M.C. Replacement of fetal calf serum by human serum as supplementation for human fibroblast culture. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.26, n.3, p.379-84, 2011.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-6, 1993.

LIN, H.T.; TARNAG, Y.M.; CHEN, Y.C.; KAO, C.L.; HSU, C.J.; SHYR, Y.M.; KU, H.H.; CHIOU, S.H. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. **Elsevier**, v.37, n., p.454-4505, 2005.

MARTIN, M.J.; MUOTRI, A.; GAGE, F.; VARKI, A. Human Embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. **Nature Medicine**, v.11, n.2, p.1-5, 2005.