

PRODUÇÃO DE CINCO DERIVADOS SANGUÍNEOS UTILIZADOS COMO SUPLEMENTO CELULAR *EX VIVO* E ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS SUPLEMENTADAS COM ESTES DERIVADOS

ALISSA SCHMIDT SAN MARTIN¹; SARAH ARANGUREM KARAM²; ANA LUIZA CARDOSO PIRES²; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE²; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO²; LUIZ ALEXANDRE CHISINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – alissasanmartin@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sarahkaram_7@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – analuizacardosopires@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fademarco@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alexandrechisini@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As terapias regenerativas vêm sendo utilizadas na odontologia com a finalidade de reparar tecidos e órgãos acometidos por patologias ou traumas (DEMARCO, 2011). Para a utilização destas terapias é necessário obter uma quantidade significativa de células para que seja possível inseri-las nos tecidos danificados. Para tanto, estas células precisam ser previamente isoladas e expandidas *ex vivo* (HEMEDA, 2014). O *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) é um meio basal de cultura tradicionalmente utilizado para manutenção de células e tecidos; ele apresenta uma quantidade elevada de aminoácidos, enzimas, vitaminas e íons para garantir adesão, crescimento e proliferação celular (GOTTIPAMULA, 2013). No entanto, o DMEM sozinho não é capaz de prover todo o suprimento nutricional requerido. Assim, o soro fetal bovino (SFB) é utilizado concomitantemente (entre 10 e 20% do volume) pelo fato de apresentar uma gama de fatores de crescimento e proteínas indispensáveis à proliferação celular (HEMEDA, 2014).

Apesar de o SFB ser o suplemento celular padrão ouro, seu uso vem sendo questionado na aplicação de terapias regenerativas. Isto se deve ao fato das células expandidas em contato com o SFB internalizarem as proteínas de origem animal presentes neste suplemento podendo desencadear reações imunológicas nos pacientes que recebem estas terapias, tornando-se uma barreira na aplicação destas técnicas (HAQUE, 2015; MACKENSEN, 2000; TUSCHONG, 2002).

Visando aumentar a transição clínica, alternativas ao SFB vem sendo propostas (HEMEDA, 2014). Suplementos autógenos, como os derivados do sangue venoso humano, mostram-se promissores substitutos a essa suplementação por promoverem a manutenção celular e serem de fácil obtenção. Diversos protocolos e suplementos provenientes do sangue venoso têm sido investigados (PHAM, 2014; BUDIYANTI 2015). De forma geral, eles são baseados na liberação de fatores de crescimento presentes nos grânulos alpha das plaquetas (HARRISON, 1993) que podem ser ativados por centrifugação, aplicação de trombina ou cloreto de cálcio (BORIE, 2015; KEWASE, 2013). No entanto, a literatura carece de investigações que comparem os diferentes protocolos em uma mesma linhagem celular limitando o conhecimento.

Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever o protocolo de obtenção de cinco derivados sanguíneos e avaliar o comportamento celular de fibroblastos 3T3\NIH suplementados com estes derivados.

2. METODOLOGIA

Para a realização dos suplementos substitutos do SFB, sangue humano de um único doador (sexo masculino, 27 anos) foi obtido no Hemocentro Regional de Pelotas (HEMOPEL). Para a confecção do Soro Humano (hSerum), as amostras foram depositadas em um tubo de 10 ml para coleta sanguínea a vácuo, sem utilização de agentes coagulantes. Os frascos foram armazenados a 4°C *overnight* para a obtenção do coágulo. Posteriormente, o coágulo foi centrifugado a uma frequência de 3000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e armazenado num congelador (-80°C).

O plasma pobre em plaquetas obtido a partir do plasma rico em plaquetas (PPP-PRP) foi adquirido através da centrifugação (2400 rpm durante 10 minutos) de amostras de sangue coletadas em tubos de vidro de 4ml contendo anticoagulante. O concentrado de plaquetas e plasma acelular foram transferidos para um novo frasco sem anticoagulante, onde foram novamente centrifugadas a 3600 rpm por 15 minutos. Assim, houve uma nova concentração das plaquetas com um sobrenadante acelular. 2/3 deste sobrenadante foi alicotado, sendo denominado PPP-PRP.

O PRP ativado (a-PRP) foi adquirido seguindo o protocolo acima citado, então, um terço restante do plasma acelular com o concentrado total de plaquetas foi ressuspensionado em 100ul/ml de CaCl_2 (20% peso / volume) e incubado a 4°C *overnight* para ocorrer a formação de coágulo. Uma nova centrifugação (1500 rpm durante 5 min) foi realizada, e o sobrenadante foi armazenado a -80°C.

A partir do a-PRP foi obtido o lizado de plaquetas (hPL), submetendo o a-PRP a três ciclos de congelamento (-80°C por 15 minutos) e descongelamento (37°C) e posteriormente a uma nova centrifugação de 1500 rpm por 5 minutos.

Para a obtenção do plasma pobre em plaquetas a partir da fibrina (PPP-F) o sangue foi depositado em tubos sem anticoagulante e centrifugado a 1.500 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante da porção correspondente ao PPP da fibrina foi pipetado e transferido para frascos de 15 ml (CHOUKROUN, 2001).

Para a realização do cultivo celular criotubos contendo 50×10^4 células 3T3\NIH foram descongeladas e inicialmente cultivadas com o SFB 10% associado ao DMEM. Na terceira passagem elas foram desagregadas com o uso de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) numa concentração de 0,25%, logo após a tripsina-EDTA foi inativada com DMEM/SFB e as células foram submetidas à centrifugação (1000 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi eliminado e as células suspensas em DMEM para a aplicação dos diferentes suplementos. O SFB foi utilizado como grupo controle. As células foram mantidas em frascos de cultura (75cm³) incubadas num ambiente húmido a 37°C e 5% de CO₂.

Para analisar o comportamento dos fibroblastos 3T3\NIH as células foram acompanhadas por 30 dias. Quando atingiam subconfluência de 80% tripsina-EDTA 0,05% era utilizada para desagregar as células e ¼ de célula era mantido para a cultura seguinte. Alguns estudos têm encontrado uma sensibilidade elevada de células mantidas com diferentes derivados sanguíneos (GOTTIPAMULA, 2012; ICHIYANAGI, 2010; BIEBACK, 2010), dessa forma, foi realizado um *screening* avaliando a sensibilidade das células à tripsina/EDTA. O teste foi realizado na terceira passagem das células em concentrações de tripsina/EDTA que variaram de 0.25% (1x) a 0.00333% (75X).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros apresentaram rendimento diferentes que variam de 3 ml a 9 ml com 20 ml de sangue total. O tempo necessário para a fabricação dos soros oscilou entre alguns minutos e algumas horas, sendo possível obter o suplemento em um ou dois dias de acordo com o protocolo. O hPL apresentou o menor rendimento e uma necessidade maior de tempo para a produção. Em contraste, PPP-PRP apresentou um maior rendimento (9 ml) e hSerum o menor tempo gasto (10 minutos). De forma geral, os cinco suplementos aqui descritos apresentaram um bom rendimento e baixo tempo de produção.

Durante os 30 dias de acompanhamento das células o hSerum e o a-PRP atingiram subconfluência nove vezes, enquanto o PPP-F, hPL e P-PRP atingiram seis vezes e o SFB quinze vezes. Acredita-se que o PPP-F e hPL alcançaram a subconfluência menor por apresentarem dificuldade de adesão a placa após desagregação por tripsina/EDTA. Observou-se também que a partir da terceira/quinta passagem ocorreram alguns descolamentos em placa, observados em todos os grupos. BIEBACK et al. 2010 observou uma grande alteração na expressão gênica de proteínas relacionadas com a adesão celular em células mesenquimais suplementadas com derivados sanguíneos. Estes resultados corroboram com o observado no presente estudo, onde observamos uma menor capacidade de adesão nas células suplementadas com os cinco diferentes derivados sanguíneos.

Analizando o padrão de crescimento e disposição celular, foram constatados padrões diferentes de crescimento entre os grupos: hSerum, PPP-F e PPP-PRP apresentaram um padrão de crescimento semelhante ao do SFB. Em contraste, a-PRP e hPL apresentaram um crescimento estrelado, com prolongamentos celulares finos e longos assim como apresentaram espaços entre as células mesmo em subconfluência. Além disso, houve formação de *clusters*, mostrando uma preferência celular por estas áreas. Estas regiões de *clusters* podem ser explicadas pelo fato do DMEM utilizado apresentar uma elevada quantidade de cálcio, assim, este cálcio que ativa a cascata da coagulação nas fibrinas remanescentes nos suplementos, realizando uma pequena coagulação em alguns sítios (HEMEDA 2014)

Durante os 30 dias de cultivo, foi observado que os fibroblastos 3T3\NIH suplementados com derivados do sangue humano apresentaram uma alta sensibilidade à tripsina-EDTA. Então, foi realizado um *screening* para avaliar a sensibilidade destas células a este agente desagregante. Os resultados demonstraram uma extrema sensibilidade à tripsina-EDTA à 0,25%, com uma desagregação instantânea das células no a-PRP, hPL e P-PRP. Além disso, diluições sucessivas também reduziram em parte a sensibilidade destas células. Para a tripsina-EDTA ter uma ação similar ao do SFB nos suplementos derivados do sangue humano ela deve ter uma diluição maior (entre 50 e 75x) ou um tempo de exposição menor (cerca de 2 minutos).

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados observados no presente estudo foi evidenciado que os cinco suplementos propostos parecem ser efetivos na manutenção e proliferação celular, sendo alternativas válidas para substituição do SFB. Além disto, foi observado uma grande sensibilidade a tripsina-EDTA, sendo possível realizar uma diminuição do tempo de exposição e concentração. Entretanto investigações em um ambiente tridimensional devem ser conduzidos para uma

melhor avaliação e aplicação clínica de células suplementadas com derivados sanguíneos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONDE, MC. et al. Stem cell-based pulp tissue engineering: variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature. **International Endodontic Journal**. v. 49, n. 6, p. 543-550, 2016
2. DEMARCO, FF. et al. Dental pulp tissue engineering. **Brazilian Dental Journal** v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011
3. HEMEDA, H, et al. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**. v. 16, n. 2, p. 170-180, 2014
4. BIEBACK, K. et al. Altered Gene Expression in Human Adipose Stem Cells Cultured with Fetal Bovine Serum Compared to Human Supplements. **Tissue Engineering Part A**. October 2010, v.16, n.11, p. 3467-3484, 2010.
5. ICHIYANAGI, T. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow wastes of spinal fusion procedure (TLIF) for low back pain patients and preparation of bone dusts for transplantable autologous bone graft with a serum glue. **BioScience Trends**, v. 4, n. 3, p.110-118, 2010
6. GOTTIPAMULA, S. et al. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 6, p. 608 – 627, 2013.
7. HAQUE, N. et al. Optimization of Pre-transplantation Conditions to Enhance the Efficacy of Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 3, p. 324-334, 2015.
8. MACKENSEN, A. et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer Immunol Immunother**, v. 49, n. 3, p. 151-156, 2000.
9. TUSCHONG, L. et al. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. **Human Gene Therapy**, v. 13, n. 13, p. 1605-1610, 2002.
10. PHAM, PV. et al. Good manufacturing practice-compliant isolation and culture of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Translational Medicine**, v.12, n.56, 2014.
11. BUDIYANTI, E. et al. Umbilical cord derived mesenchymal stem cell proliferation in various platelet rich plasma and xeno-material containing medium. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 7-13, 2015
12. HARRISON, P. et al. Platelet alpha-granules. **Blood Reviews**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 1993.
13. KAWASE, T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. **Odontology**, v. 103, n. 2, p. 126-135, 2015.
14. BORIE, E. et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 5, p. 7922-7929, 2015.
15. CHOUKROUN, J. et al. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. **Implantodontie**, v. 42, p. 55-62, 2001.