

GEL DE PLAQUETAS: ARCABOUÇO 3D PARA CULTURA CELULAR

PLATELET GEL: 3D SCAFFOLD FOR CELL CULTURE

ANDREI MOROZ, RENATA APARECIDA CAMARGO BITTENCOURT, SÉRGIO LUIS FELISBINO, HAMILTON DA ROSA PEREIRA, ROSANA ROSSI-FERREIRA, ELENICE DEFFUNE.

RESUMO

Introdução: O reparo tissular é o objetivo final da cirurgia. A cultura celular requer arcabouço mecânico que dê suporte ao crescimento celular e difusão dos nutrientes. O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) como um arcabouço 3D possui diversas vantagens: é material biológico, de fácil absorção pós-transplante, rico em fatores de crescimento, em especial PDGF- $\beta\beta$ e TGF- β que estimula síntese de matriz extracelular na cartilagem. **Objetivo:** Desenvolver arcabouço 3D à base de PRP. **Materiais e Métodos:** Duas formas foram idealizadas: Sphere e Carpet. Condições estéreis foram utilizadas. O gel de plaquetas permaneceu em cultura celular, observado diariamente em microscópio invertido. **Resultados:** Ambos arcabouços obtiveram sucesso, com aspectos positivos e negativos. **Discussão:** A forma Sphere não aderiu ao plástico. Observou-se retração do gel e investigação ao microscópio dificultada devido às áreas opacas no campo visual. A forma Carpet não aderiu ao plástico e apresentou-se translúcida. O tempo de estudo foi de 20 dias. **Conclusões:** A produção de um arcabouço 3D PRP foi um sucesso, e trata-se de uma alternativa que necessita ser mais utilizado e investigado para que se consolide em uma rota eficiente e confiável na tecnologia de engenharia tissular, particularmente em cultura de tecido cartilaginoso.

Descritores: Técnicas de cultura de células. Tecidos suporte. Engenharia tissular.

Citação: Moroz A, Bittencourt RAC, Felisbino SL, Pereira HR, Rossi-Ferreira R, Deffune E. Gel de plaquetas: arcabouço 3D para cultura celular. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2009;17(2):43-5. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

O reparo de tecidos e órgãos foi o objetivo final da cirurgia das épocas antigas até a presente, e foi tradicionalmente realizado de duas formas: enxerto de tecidos ou substituição por material sintético. O ouro foi utilizado em defeitos cranianos datando de 2000 AC, e o enxerto de tecidos foi usado desde pelo menos 1660 DC. Ambos os métodos, entretanto, têm limitações. O enxerto de tecidos requer mais cirurgias, associadas à morbidade, e é restringido por quantidade limitada de material. Os materiais sintéticos integram-se mal com o tecido e podem falhar com o tempo devido ao desgaste e fadiga, ou resposta adversa do corpo. A engenharia de tecidos (EngTec) emergiu em 1990 para corrigir as limitações do enxerto de tecidos e uso de materiais sintéticos. O conceito da EngTec é transplantar um biofator (células, genes ou proteínas) dentro de um material degradável poroso (*scaffold*). Os biofatores incluem *stem cell* e a gene-terapia, que estimulam o reparo do tecido.¹ O objetivo da engenharia de tecidos é restaurar e preservar as funções perdidas por órgãos doentes ou danificados. Como *in*

ABSTRACT

Introduction: Tissue repair has been the ultimate goal of surgery. Cell culture requires a mechanical scaffold that supports cell growth and nutrient diffusion. Using platelet-rich plasma (PRP) as a 3D scaffold presents various advantages: it is a biological material, easily absorbed after transplantation, rich in growth factors, in particular, PDGF- $\beta\beta$ and TGF- β that stimulate extracellular matrix synthesis in cartilage culture. **Objective:** To develop a PRP 3D scaffold. **Material and Methods:** Two forms were idealized: Sphere and Carpet. Sterile conditions were used. The platelet gel remained in culture conditions, observed at an inverted microscope on a daily basis. **Results:** Both forms were successful because they produced a 3D environment that supports cell growth, with positive and negative features. **Discussion:** The Sphere form didn't attach to the plate. Gel retraction was observed and the investigation at the microscope was difficult, because of the opaque areas in the optical field. The Carpet form didn't retract, and didn't produce opaque areas. **Follow-up time** was 20 days. **Conclusions:** The production of a PRP 3D scaffold was successful, and this is an alternative requiring further investigation in order to establish an efficient and reliable route in tissue engineering technology, particularly in cartilage tissue culture.

Keywords: Cell culture techniques. Tissue scaffolds. Tissue engineering.

Citation: Moroz A, Bittencourt RAC, Felisbino SL, Pereira HR, Rossi-Ferreira R, Deffune E. Platelet gel: 3d scaffold for cell culture. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2009;17(2):43-5. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

vivo, os tecidos projetados *in vitro* devem fornecer transporte de nutrientes, estabilidade mecânica, coordenação de processos multicelulares e um microambiente celular que preserve a estabilidade fenotípica das células. Para conseguir este objetivo, muitos tecidos projetados requerem características arquiteturais da escala macro (cm) e micro (aproximadamente 100 micra) e as técnicas de cultura celular foram adaptadas para criar *scaffolds* com as arquiteturas tridimensionais (3D) definidas em escalas relevantes ao sucesso fisiológico do tecido.² Caso contrário, se cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz de outro tipo celular.³ Assim, perde-se a funcionalidade do tecido, como é observado em cultura de cartilagem em monocamadas, onde os condrócitos desdiferenciam em fibroblastos, e passam a produzir colágeno tipo I. Longe de serem componentes passivos, o material escolhido e o *design* poroso da arquitetura do *scaffold* são fatores cruciais no sucesso da regeneração do tecido. Um *scaffold* bem sucedido

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista.

Endereço para Correspondência: Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu. Divisão Hemocentro. Laboratório de Engenharia Celular. Distrito de Rubião Júnior - S/N. Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-000. E-mail: andreimoroz@terra.com.br

Trabalho recebido em 11/01/08 aprovado em 06/10/08

deve prover sustentação mecânica ao mesmo passo que promove o transporte em massa, e ainda, degradar-se de maneira que o tecido regenerado assume suas funções.¹

Vários sistemas de cultura já foram usados: cultura em monocamadas, cultura em gel de agarose⁴, hidrogel e polímeros sintéticos como: arcabouços à base de colágeno (gel de colágeno tipo I e II), esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato⁵, e mais recentemente, celulose bacteriana.⁶

Investigando o papel da plaqueta idealizou-se a sua utilização, sob a forma de gel, como arcabouço 3D para cultura celular baseando-se na secreção de uma série de hormônios interfaceados com a adesão, cicatrização e neovascularização dos seus grânulos. A possibilidade de uso do plasma rico em plaquetas (PRP) como um arcabouço 3D em forma de gel para sustentação das células possui diversas vantagens. Entre elas, lista-se ser um material biológico, que apresenta fácil reabsorção após a fase de transplantação, pode ser produzido com concentrado de plaquetas do próprio paciente que receberá o transplante, trata-se de um material barato, além de serem ricos em fatores de crescimento, em particular, PDGF e TGF que estimulam a síntese de matriz extracelular⁷, são importantes para diferenciação em muitas linhagens celulares, especialmente na cultura de cartilagem, além de serem extremamente caros de se adquirir.

OBJETIVOS

O desafio do presente trabalho foi definir o uso do PRP como arcabouço 3D para cultura celular quanto à sua forma, concentrações de reagentes e determinação do número máximo de dias que o gel se mantém firme na presença do meio de cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados cinco coelhos Nova Zelândia neste trabalho, e o mesmo está aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição segundo o protocolo 626. Todos os procedimentos foram conduzidos em condições estéreis. O PRP foi obtido através de centrifugação de sangue total (obtido por punção cardíaca) a 1000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o PRP foi alíquotado em tubos cônicos de 15ml e uma amostra (200µL) foi levada para determinação do número de plaquetas em contador automático Micros60 HoribaABX®. Uma vez separado em volumes de 2,3ml foram preparados os géis, utilizando-se concentração fixa de gluconato de cálcio e concentrações variadas de trombina em placas de Petri. Foram testados os géis a partir de PRP fresco e PRP descongelado.

São propostas duas formas para os géis: um mais volumoso, e um tapete mais uniforme e com menos volume (mas ainda em 3D). Estas formas foram obtidas da seguinte maneira: após adicionar o gluconato de cálcio (GC) e a trombina ao PRP no tubo cônico de 15ml, podia-se esperar a solidificação para depois colocar o gel na placa de petri, obtendo-se desta forma o gel *Sphere*; ou então logo após adicionar GC e trombina ao PRP no tubo vertia-se o conteúdo na placa, de modo que este cobrisse toda a extensão da mesma e solidificasse como um tapete, denominado gel *Carpet*.

O meio de cultura utilizado foi DMEM High Glicose (Gibco®) 10% soro fetal bovino (Gibco®) suplementado com L-glutamina (Gibco®) e antibiótico/antimicótico (Gibco®), o qual foi trocado uma vez por semana. As placas estiveram em estufa de CO₂ 5% (Thermo®) por toda a duração do experimento. Efetuou-se registro fotográfico (Canon PowerShotA620®) durante os três primeiros dias, e no último dia. A observação das placas, a olho nu e ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert®) foi feita diariamente. Além disso, foram batidas fotos ao microscópio para verificação da microestrutura dos géis formados.

RESULTADOS

A contagem de plaquetas obtidas variou entre 442 x 10³/mm³ e 513 x 10³/mm³. O tempo de formação do gel variou entre 5 segundos (com concentração de trombina 6X) até 40-45 segundos (com

as menores concentrações, de 1X e 2X). Os géis tiveram vida útil de 20 dias. Os géis *Sphere* (Figura 1) apresentaram áreas opacas ao microscópio invertido (Figura 2), enquanto os géis *Carpet* (Figuras 3 e 4) não as apresentaram. (Figura 5) O gel feito com plaquetas descongeladas (Figura 6) se apresentou mais translúcido ao microscópio em relação ao com plaquetas frescas.

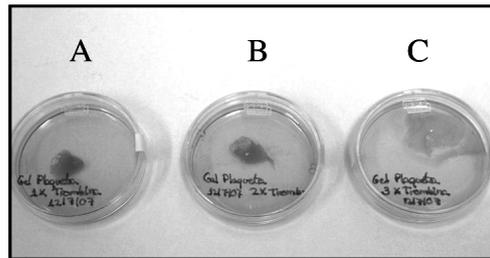


Figura 1 - Géis *Sphere* 1X, 2X e 3X Trombina, (A,B,C) respectivamente.

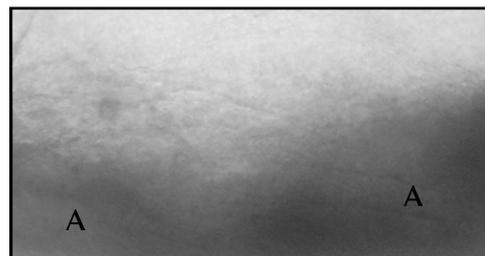


Figura 2 - Microfotografia do gel *Sphere* 1X Trombina. Notar as áreas opacas (A). Aumento 10x.

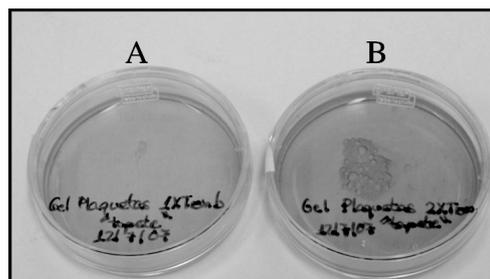


Figura 3 - Géis *Carpet* 1X (A) e 2X Trombina (B)

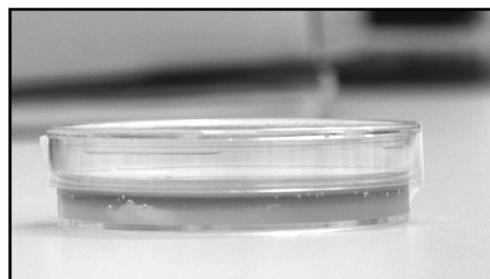


Figura 4 - Gel *Carpet* 1X Trombina.

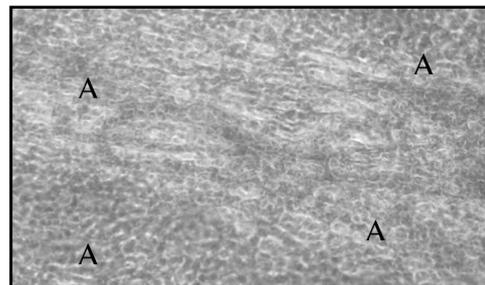


Figura 5 - Microfotografia do Gel *Carpet* 1X. Notar as áreas translúcidas (A). Aumento 10x.

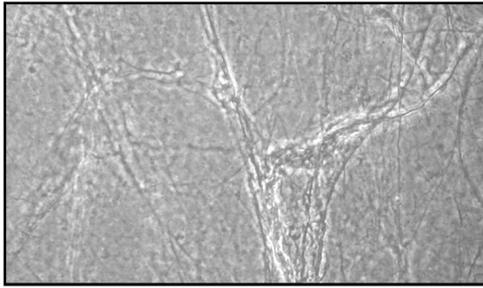


Figura 6 - Microfotografia do Gel Carpet com plaquetas descongeladas. Aumento 10x.

DISCUSSÃO

Todos os géis produzidos solidificaram pela ação do gluconato de cálcio e da trombina. As duas propostas para os géis (*Sphere* e *Carpet*) apresentaram estrutura 3D tendo assim o primeiro requisito para um bom *scaffold* alcançado. Os dois modelos evidenciam pontos positivos e negativos: o gel *Sphere* não aderiu à placa de cultura, assim foi mais fácil trocar o meio sem danificar o gel e para fazer uma análise histológica bastaria retirá-lo da placa de cultura. Entretanto, a visualização ao microscópio é mais difícil, devido ao maior volume que produziu as áreas opacas obtidas nas microfotografias (Figura 2), onde seria impossível de visualizar quaisquer células que ali estivessem. Foi observada uma retração no tamanho do gel no segundo dia. Em um projeto piloto a ser realizado o PRP será diluído antes da formação do gel *Sphere*, com o objetivo de obter-se um gel translúcido. O gel *Carpet* se mostrou mais homogêneo, íntegro, não houve retração ou áreas opacas ao microscópio. (Figura 5) Em um processo de cultura celular isso significa grandes vantagens, já que uma das principais ferramentas é a análise diária das placas por microscopia. Como pontos negativos, cita-se a aderência à placa, o que dificulta a troca do meio de cultura (particularmente com bomba a vácuo); além disso, cita-se também a dificuldade em retirar o gel da placa quando se quer analisá-lo histologicamente.

Quanto às concentrações de trombina utilizadas, observou-se que todas eram suficientes para ativar a agregação plaquetária e formar o gel. O único fator que variou mediante as diferentes concentrações foi o tempo de formação do gel, que diminuiu quando se aumentou a dose de trombina. Isso explica a utilização de apenas duas concentrações testadas nos géis *Carpet* (1X e 2X).

O gel *Carpet* produzido com o dobro do volume de PRP (4,6ml) se mostrou mais firme e fácil de manejar - em relação aos géis *Carpet* com 2,6mL de PRP - nas trocas de meio de cultura por ser mais evidente a interface gel/meio, sem ter prejudicado o processo de investigação diária por microscopia. O gel feito com plaquetas descongeladas apresenta a vantagem de fornecer melhores condições de visualização microscópica (translúcido), devido à ruptura das plaquetas durante o descongelamento, assim como a liberação dos fatores de crescimento dos grânulos- α .

Todos os géis se mantiveram firmes por 20 dias em estufa, quando foram descartados. O vigésimo dia foi considerado como o último

neste trabalho, já que três semanas são suficientes para conduzir um experimento em cultura celular, mas é provável que os géis tenham uma vida útil ainda maior.

CONCLUSÃO

Este trabalho representa uma inovação na tecnologia de produção de *scaffolds* 3D para cultura celular, pois é pioneiro ao utilizar as plaquetas diretamente no suporte mecânico às células. São evidentes as vantagens das plaquetas neste campo da ciência, em relação a muitos outros *scaffolds* 3D atualmente utilizados, muitos dos quais já estão consagrados, como as pérolas de alginato. Aos autores, esta primeira experiência com as plaquetas se mostrou muito promissora, pois se conseguiu criar com êxito dois modelos de utilização do gel de plaquetas como *scaffolds* 3D para cultura celular: *Sphere* e *Carpet*. Ambos se mostraram eficientes em criar ambientes 3D, aparentemente porosos, sendo necessários alguns ajustes para melhorar o microambiente para as células, em ambos os modelos. Os autores acreditam que o modelo *Sphere* pode ser melhorado apenas com a utilização de menores volumes de PRP (com a conseguinte formação de pérolas de plaquetas) ou então com uma diluição, o que em ambos os casos levará a uma diminuição no número de plaquetas utilizados e melhora na visualização das células por microscopia invertida. Entretanto somente novos experimentos, com a utilização de células, podem responder a essa questão. O gel *Carpet* também pode ser melhorado no sentido de buscar um volume ótimo de plaquetas, que forneça boas condições de investigação microscópica e microambiente favorável às células, sendo também necessários novos experimentos, com células, para alcançar este objetivo. Como considerações finais, o presente trabalho abre um novo caminho na ciência de produção de arcabouços 3D, o qual necessita ser trilhado para se consolidar em uma nova e eficiente rota da tecnologia de produção de arcabouços 3D para a medicina reparadora de órgão e tecidos. O uso do PRP no *scaffold* surge como promissor aliado na cultura celular, em especial de cartilagem, por dois motivos fundamentais: 1) possibilidade de utilizar material autólogo, onde o *scaffold* é preparado com material oriundo do próprio paciente, facilitando a etapa de integração do futuro implante; 2) de serem a plaqueta e o PRP ricos em fatores de crescimento celular que atuam endogenamente, não criando risco outros para o paciente.

Consideramos que o gel de plaquetas possa ser utilizado como *scaffold* 3D, na área da ortopedia, junto ao procedimento de transplante autólogo de condrócitos, com a microencapsulação dos condrócitos previamente expandidos em cultura celular, substituindo os *scaffolds* empregados atualmente. Outra possibilidade futura seria o uso de células-tronco mesenquimais, diferenciadas em condrócitos, empregando-se o *scaffold* descrito neste artigo, e então o transplante para a área da lesão articular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio da equipe do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da FMB, bem como ao Laboratório Experimental de Cirurgia e Ortopedia, em especial ao Sr. Ednelson Henrique Bianchi, pelo excelente auxílio técnico.

REFERÊNCIAS

- Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005;4:518-24.
- Tsang VL, Bhatia SN. Fabrication of three-dimensional tissues. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;103:189-205.
- Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982;30:215-24.
- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci.* 1994;107:17-27.
- Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:9996-10001.
- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials.* 2005;26:419-31.
- Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002;18:27-33.