



## Artigo Original

# Proliferação e diferenciação de células-tronco em contato com eluato de membrana de fibrina



Fernanda Gimenez de Souza<sup>a,\*</sup>, Beatriz Luci Fernandes<sup>a</sup>,  
Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto<sup>a</sup>, Alessandra Melo de Aguiar<sup>b</sup>,  
Letícia Fracaro<sup>a</sup> e Paulo Roberto Slud Brofman<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Curitiba, PR, Brasil

### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 30 de agosto de 2016

Aceito em 28 de outubro de 2016

On-line em 20 de janeiro de 2017

Palavras-chave:

Plasma rico em plaquetas

Membranas

Cartilagem

Regeneração

### R E S U M O

**Objetivo:** Avaliar a capacidade do eluato proveniente da membrana de plasma rico em fibrina (PRF) de induzir proliferação e diferenciação das células-tronco humanas isoladas de tecido adiposo (CTDAh) em condrócitos.

**Método:** As membranas de PRF foram obtidas por centrifugação de sangue periférico de dois indivíduos saudáveis, cortadas, colocadas em poços de placa de cultivo por 48 h para obtenção do eluato de fibrina. As CTDAh foram isoladas do tecido adiposo por digestão com solução de colagenase e expandidas *in vitro*. As células foram expandidas e tratadas com meio de cultivo DMEM-F12, meio comercial para diferenciação condrocítica, e eluato de fibrina durante três dias e marcadas com BrdU para avaliação quantitativa da proliferação celular com o uso do sistema de imagens High-Content Operetta<sup>®</sup>. Para o ensaio de diferenciação condrogênica, as CTDAh foram cultivadas em micromassa por 21 dias e coradas com azul de toluidina e agrecana para avaliação qualitativa em microscópio óptico. As avaliações estatísticas foram feitas por meio dos testes Anova e Tukey.

**Resultados:** Houve uma maior proliferação das células tratadas com o eluato de fibrina comparativamente com os outros dois tratamentos, nos quais o teste Anova apontou significância ( $p < 0,001$ ). A diferenciação em condrócitos foi visualizada pela presença de mucopolissacarídeos na matriz das células tratadas com meio de diferenciação ou eluato e marcação positiva para agrecana.

**Conclusões:** O tratamento com o eluato da membrana de fibrina estimulou a proliferação celular e induziu a diferenciação das células-tronco em condrócitos, o que sugere uma potencial aplicação da membrana de PRF nas terapias de regeneração de cartilagem hialina.

© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondência.

E-mail: [beatriz.fernandes@pucpr.br](mailto:beatriz.fernandes@pucpr.br) (F.G. Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.rbo.2016.10.004>

0102-3616/© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Proliferation and differentiation of stem cells in contact with eluate from fibrin-rich plasma membrane

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Platelet-rich plasma  
Membranes  
Cartilage  
Regeneration

**Objective:** To evaluate the ability of the eluate from fibrin-rich plasma (FRP) membrane to induce proliferation and differentiation of isolated human adipose-derived stem cells (ASCs) into chondrocytes.

**Method:** FRP membranes were obtained by centrifugation of peripheral blood from two healthy donors, cut, and maintained in culture plate wells for 48 h to prepare the fibrin eluate. The SCATH were isolated from adipose tissue by collagenase digestion solution, and expanded *in vitro*. Cells were expanded and treated with DMEM-F12 culture, a commercial media for chondrogenic differentiation, and eluate from FRP membrane for three days, and labeled with BrdU for quantitative assessment of cell proliferation using the High-Content Operetta<sup>®</sup> imaging system. For the chondrogenic differentiation assay, the SCATH were grown in micromass for 21 days and stained with toluidine blue and aggrecan for qualitative evaluation by light microscopy. The statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey's test.

**Results:** There was a greater proliferation of cells treated with the eluate from FRP membrane compared to the other two treatments, where the ANOVA test showed significance ( $p < 0.001$ ). The differentiation into chondrocytes was visualized by the presence of mucopolysaccharide in the matrix of the cells marked in blue toluidine and aggrecan.

**Conclusions:** Treatment with eluate from FRP membrane stimulated cell proliferation and induced differentiation of the stem cells into chondrocytes, suggesting a potential application of FRP membranes in hyaline cartilage regeneration therapies.

© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

Dentre as doenças degenerativas que acometem as pessoas idosas, a degradação do tecido cartilaginoso articular, processo conhecido como osteoartrite ou osteoartrose (OA), é uma das mais ocorrentes.<sup>1</sup>

A funcionalidade da cartilagem depende da integridade da sua matriz extracelular (MEC) e do arranjo de seus componentes moleculares. A susceptibilidade da cartilagem articular à progressão para a OA é devida à sua capacidade limitada de autorregeneração causada pela baixa atividade mitótica dos condrocitos e pela sua natureza avascular.<sup>2,3</sup>

Em grandes articulações que são submetidas a atrito e que suportam peso, os defeitos na cartilagem não se regeneram espontaneamente e necessitam de intervenção terapêutica. Os tratamentos convencionais disponíveis para reparar defeitos de cartilagens, como as abordagens não cirúrgicas de injeção de glucosamina, esteroides e ácido hialurônico, ou tratamento cirúrgico como o debridamento, apenas aliviam a dor e não restauram a superfície articular.<sup>4</sup> As técnicas tradicionais são, portanto, paliativas. Lavagem e condroplastia promovem alívio sintomático da dor sem formação de tecido hialino. Essas técnicas removem a camada superficial da cartilagem, o que inclui as fibras de colágeno, que são responsáveis pela resistência mecânica e criam um tecido cartilaginoso com funcionalidade inferior. A técnica de debridamento subcondral ou microfratura tem sido considerada como estimulante para a produção de tecido semelhante ao

hialino com propriedades e durabilidade comparáveis à cartilagem normal. No entanto, tem-se observado que, em muitos casos, ocorre a formação de tecido fibrocartilaginoso que se degenera com o tempo. Transplante osteocondral autólogo e mosaicoplastia (autotransplante de cartilagem) podem restaurar o tecido cartilaginoso, mas suas aplicações são restritas a pequenos defeitos e existem algumas preocupações em relação à morbidade do local doador.<sup>5</sup> O tratamento da OA e dos defeitos locais da cartilagem articular permanece um desafio. Não existem, atualmente, tratamentos cirúrgicos ou não cirúrgicos que resultem na reparação ou restauração da superfície danificada.

De acordo com o exposto, os métodos de tratamento atuais não fornecem um resultado satisfatório em longo prazo, o que impulsiona investigações em abordagens inovadoras na área da engenharia de tecidos com o uso de biomateriais como arcabouços para a formação de tecido novo.<sup>6,7</sup> Dentre os biomateriais estão aqueles naturais autólogos, como a membrana de plasma rico em fibrina (PRF). A membrana de fibrina pode ser facilmente isolada do plasma proveniente do sangue periférico do próprio paciente, por centrifugação, quando é formada uma membrana densa de PRF que pode ser prontamente usada depois de exsudada. O PRF exsudado contém quantidade significativa de fatores de crescimento, além de matriz de glicoproteínas, particularmente fibronectina e vitronectina, duas proteínas-chave para permitir o contato célula-matriz extracelular.<sup>8</sup>

A membrana de fibrina, portanto, é um biomaterial natural autólogo rico em glicoproteínas e em fatores de crescimento,

de fácil preparação e de baixo custo. Por ser autólogo, não existe risco de infecção ou do desencadeamento de processos autoimunes. Do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da membrana de plasma rico em fibrina (PRF) de induzir proliferação e diferenciação das células-tronco humanas, derivadas de tecido adiposo, em condrócitos.

## Material

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-PR, com o parecer nº 1.348.208.

Foi feita a coleta do sangue periférico de dois voluntários saudáveis para obtenção da membrana de fibrina. Os participantes foram escolhidos de acordo com os critérios de inclusão: entre 18 e 55 anos; mínimo de 54 kg de massa corpórea; não ser portador de doenças crônicas ou autoimunes; não ser fumante; não ter ingerido aspirina ou outros medicamentos que possam interferir no processo de coagulação nas últimas duas semanas. Os critérios de exclusão foram: estar gestante; apresentar quadro de insuficiência arterial e/ou venosa periférica; fazer uso contínuo de medicamentos anticoagulantes.

As células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (CTDAh) foram obtidas por meio da cirurgia de lipoaspiração de um único doador, do qual foram isoladas e expandidas. O doador aceitou a doação e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## Método

### Preparação das membranas de fibrina e do eluato

Foram extraídos 80 ml de sangue da veia antecubital (superficial) de cada participante com o auxílio de um dispositivo Scalp 21G (BD Vacutainer®) para o preenchimento de oito tubos de plástico de 10 ml para coleta de sangue por vácuo (BD Vacutainer®), devidamente esterilizados e identificados com códigos. Os tubos não continham anticoagulantes, mas continham ativador de coágulo. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado (centrífuga digital Spinlab) a 770 g durante 12 minutos em temperatura ambiente controlada de 20 °C. Depois da centrifugação, o coágulo de PRF foi retirado com o auxílio de uma pinça esterilizada e, com uma tesoura estéril, a pequena parte de células vermelhas aderidas à sua extremidade foi retirada. Em seguida, os coágulos foram prensados com o auxílio de uma chapa de aço inoxidável (Box PRF BmdCon®) também esterilizada para retirada do soro (extração do exsudado). Obteve-se, então, a membrana de PRF.<sup>9</sup> As membranas foram usadas imediatamente à sua produção para obtenção do eluato, o que evitou qualquer degeneração proteica, que pode ocorrer em, no máximo, 3 h.

Oito membranas de PRF dos dois participantes, assim que extraídas e exsudadas, foram cortadas com auxílio de uma pinça estéril para biópsia punch (n° 6 mm Miltex®) em três círculos de 6 mm e foram colocadas em poços de placas de cultivo de 6 poços (GreinerBio-One). Em seguida, foram adicionados 5 ml de meio de cultura DMEM-F12 sem SBF em cada poço. Os sobrenadantes das placas foram retirados depois de 48 h e

transferidos para tubos de 50 ml e mantidos entre 2 e 8 °C.<sup>10</sup> Dessa forma foi obtido o eluato de cada indivíduo.

### Isolamento e expansão das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh)

O frasco com 50 ml do tecido adiposo (TA) foi processado em um fluxo laminar, usou-se o método de digestão enzimática conforme Rebelatto et al.<sup>11</sup> Nesse processo, o TA foi lavado três vezes com 150 ml de solução salina fosfatada (PBS – Gibco™ Life Technologies, Grand Island, USA) e dissociado com colagenase tipo I (1 mg para cada mL de gordura) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), durante 30 minutos em 37 °C, com agitação constante. Após a digestão, a parte líquida inferior foi retirada e filtrada com *cell strainer* (poro de 100 µm) (BD Falcon™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). A suspensão celular foi centrifugada a 800 g por 10 minutos e os eritrócitos contaminantes foram removidos após a lise com um tampão pH 7,3.<sup>12</sup> As células foram lavadas e filtradas novamente com *cell strainer* (filtro de 40 µm) (BD Falcon™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). As células resultantes foram cultivadas em densidade de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em frascos de cultura de T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland) em meio DMEM-F12 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Gibco™ Invitrogen, NY, USA), 1% de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA).

As CTDAh foram mantidas em estufa com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>, 37 °C e 95% de umidade. Depois de 72 h de cultivo as células não aderentes foram removidas e descartadas. As trocas de meio foram feitas duas vezes por semana e as células foram mantidas até atingir confluência entre 80% e 90%. Em seguida, as células foram dissociadas (descoladas do fundo do frasco) com tripsina/EDTA 0,25% (Invitrogen™, NY, USA) e replaqueadas em outros frascos de cultivo, o que caracterizou a primeira passagem (P1). Depois da terceira dissociação (P3), as células foram suspensas em meio DMEM-F12 com 15% de SBF e contadas em câmara de Neubauer.

### Cultivo das CTDAh com o eluato de PRF

Foram distribuídas 3.000 células por poço em placas de cultura de 96 poços (GreinerBio-One) com meio DMEM-F12 e 15% de SBF, que foram mantidas em estufa com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> durante 12 h para a aderência celular.

Depois de 12 h de cultivo, retirou-se o meio com soro e foi adicionado meio sem soro para carenciamento celular (livre de SBF), com o objetivo de evitar a interferência dos fatores de crescimento do soro na proliferação celular. Depois de 24 h foram adicionados 150 µl do eluato das membranas obtidas dos dois doadores em cada poço (poços teste) e 150 µl de meio com SBF nos poços-controle. As células foram cultivadas por 3 dias. A troca de eluato das membranas e meio de cultura foi feita diariamente.<sup>13</sup> Depois de três dias de cultivo foi feita a marcação com BrdU para avaliar a proliferação celular.

Para o teste de proliferação celular, as células foram plaqueadas em sextuplicatas técnicas. Os resultados com o número total de núcleos e porcentagem de células marcadas com BrdU foram representados como a média das réplicas técnicas.

### Marcação das células com bromodeoxiuridina (BrdU) e avaliação da proliferação celular

Depois de três dias de cultivo foi feita a marcação com BrdU durante 24 h para se avaliar a proliferação celular. Para tanto, foram adicionados 50 µl por poço de BrdU (Eugene, Life Technologies, Oregon, USA) na concentração de 100 µM. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, com água destilada durante 5 minutos com agitação. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com HCl 2 N a 50 °C por 10 minutos com agitação e depois lavadas com tampão borato a 50 °C por 10 min. com agitação.

As células foram permeabilizadas com TBS-Triton 0,3% (Sigma-Aldrich) por 10 minutos com agitação. Logo após, os sítios inespecíficos foram bloqueados com TBS 10 mM + 5% soro de cabra + 1% albumina bovina + 0,1% Triton por 1 h com agitação. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo BrdU conjugado com AlexaFluor 488 (diluição 1:200) (Life Technologies, Oregon, USA) por 1 h a temperatura ambiente. Depois da marcação as células foram novamente lavadas com PBS.

Para a visualização do núcleo, usou-se o DAPI (1 µg/µL) (Eugene, Life Technologies, Oregon, USA) por 5 minutos na temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e água destilada.

Para o ensaio de proliferação celular, a placa de 96 poços foi escaneada com o sistema de imagens Hight-Content Operetta (gentilmente cedido pela Perkin Elmer®) com 10x de ampliação, foram avaliados 9 campos/poço. As imagens foram analisadas com o software Harmony 3.5.2 (Perkin Elmer®).

Foram usados marcadores específicos, que no sistema de imagem Hight-Content Operetta® evidenciou os núcleos encontrados em cada poço da placa de cultivo celular. Como marcadores foram usados: DAPI como controle para marcação dos núcleos celulares; BrdU + anti-BrdU, onde o BrdU é incorporado na timina do DNA das células em proliferação e marca, portanto, as células em divisão celular; e somente anti-BrdU como controle negativo, anticorpo secundário que tem um fluoróforo (verde) quando ligado ao BrdU.

Os dados foram analisados com o programa Graphpad Prism versão 7, com o teste Anova, seguido por teste de Tukey. Diferenças com  $p \leq 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. Os dados foram expressos com o número total de núcleos marcados e em percentual de células em proliferação durante o pulso de BrdU.

### Avaliação da diferenciação das células tronco em condrócitos

Para a diferenciação condrogênica as CTDAh foram isoladas e expandidas conforme descrito anteriormente. Essas células foram cultivadas em micromassa. Cerca de  $2 \times 10^5$  células diluídas em 0,5 ml de meio de cultura foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos, em um tubo de polipropileno de 15 ml para formar o pellet celular. As células foram cultivadas por 21 dias em três condições: meio comercial de diferenciação condrogênica (Differentiation Basal Medium Chondrogenic

(Lonza, Walkerville, USA), meio DMEM-F12 + 15% de SFB (controle) e eluato de fibrina obtido dos dois indivíduos. Para cada condição, foi adicionado ao pellet celular 0,5 ml de solução, homogeneizado e novamente centrifugado a 400 g por 10 minutos. Os tubos com as células foram incubados em estufa em 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

Sem mexer no pellet celular, o meio foi trocado a cada três dias. No 21° dia, o agregado celular foi fixado em formaldeído 10% por 1 h em temperatura ambiente, desidratado em diluições seriadas de álcool etílico, diafanizado em xilol e infiltrado por parafina líquida. Os blocos parafinados foram seccionados em micrótomo (4 µm) e as lâminas foram coradas por técnica histológica em azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a fim de expor a matriz de mucopolissacarídeos e marcadas por técnica imunocitoquímica com o anticorpo agregana (Invitrogen™, NY, USA) (1:100) para verificar a existência de matriz extracelular sintetizada por condrócitos.

## Resultados

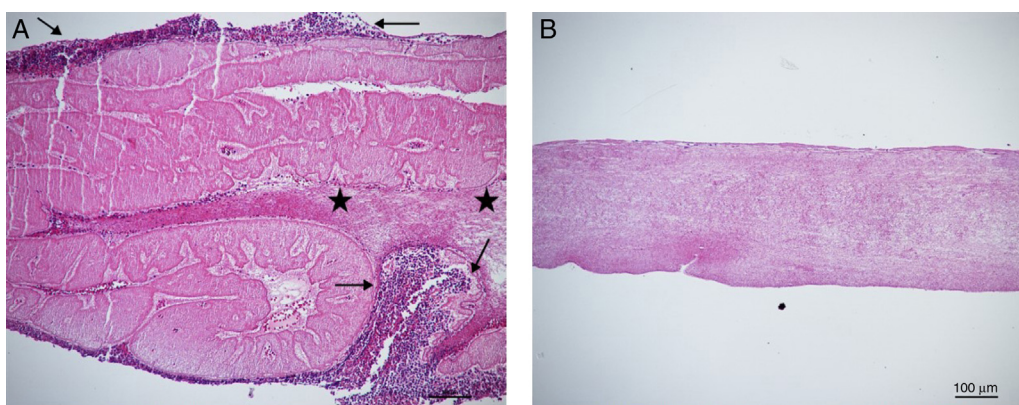
Depois das membranas de PRF serem extraídas dos tubos, foi possível identificar as três regiões na membrana identificadas por Dohan et al. (2006b),<sup>14</sup> como: trombo vermelho (“red thrombus”) caracterizado por um agregado de hemácias e plaquetas à matriz de fibrina; rede de fibrina (“fibrin clot”), área acelular formada por matriz de fibrina; e área mista (“buffy coat”), parte intermediária entre a vermelha e a branca.

A análise microscópica da membrana de PRF (fig. 1) comprovou a formação das regiões vistas macroscopicamente. Os cortes histológicos demonstraram que a parte inferior da matriz de fibrina (PRF) é ocupada por estrias esbranquiçadas (“área mista”) e agregados de fragmentos celulares (“trombo vermelho”). Entretanto, a parte superior do coágulo, constituída pela rede de fibrina, não apresenta plaquetas ou outro corpo celular.

Inicialmente os ensaios de proliferação celular foram feitos com as CTDAh diretamente sobre a membrana de fibrina, entretanto verificou-se que tinha autofluorescência depois da marcação com anticorpos, o que impedia a contagem das células pelo microscópio de infravermelho invertido Operetta®. Como opção foi adaptado o experimento de Gasling et al.<sup>13</sup> com o eluato da membrana de fibrina em vez da própria membrana.

A tabela 1 mostra a média de núcleos marcados em cada poço por tratamento no momento do cultivo. Neste estudo, foi observado que o tratamento de eluato de fibrina foi significativo para a quantidade de células marcadas em relação ao grupo controle, com o valor de  $p = 0,002$  para o teste Anova ( $n = 6$ ). O pós-teste de Tukey revelou que houve diferença significativa entre o grupo CTDAh + Eluato 1 e os demais grupos, como mostra a figura 2A.

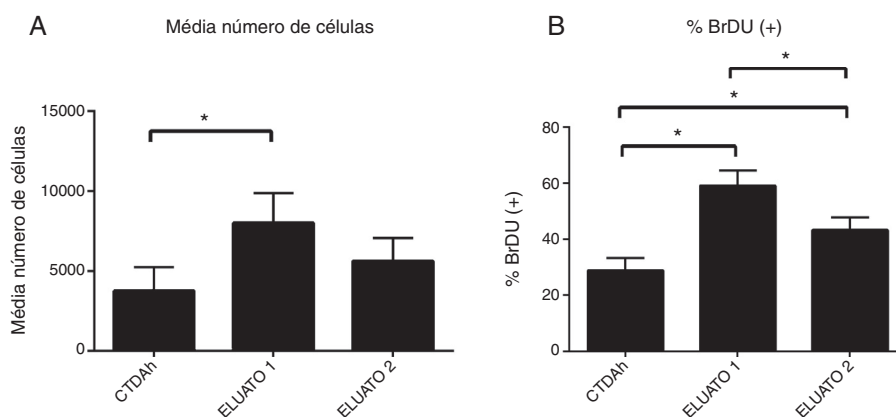
Os tratamentos com eluato de fibrina também obtiveram maior porcentagem de núcleos marcados em proliferação celular durante o pulso do BrdU (24 h) em comparação com o grupo controle (tabela 2). O teste Anova demonstrou significância, com valor de  $p < 0,0001$  ( $n = 6$ ). O pós-teste de Tukey revelou que os grupos, CTDAh + Eluato 1 e CTDAh + Eluato 2 tiveram diferença estatística em relação ao controle, e entre si, como mostra a figura 2B. Pode-se afirmar que houve



**Figura 1** – Análise microscópica da membrana de fibrina. A, acúmulo de plaquetas na região inferior (setas) em transição com a região mista que apresenta estrias esbranquiçadas (estrelas); B, área superior do coágulo com a extensa rede de fibrina. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento 10x.

**Tabela 1** – Número total de núcleos marcados logo depois do cultivo

|                  | Poço 1 | Poço 2 | Poço 3 | Poço 4 | Poço 5 | Poço 6 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CTDAh            | 1.266  | 3.433  | 4.299  | 5.372  | 5.008  | 2.986  |
| CTDAh + Eluato 1 | 5.459  | 9.356  | 9.848  | ND     | 8.620  | 6.699  |
| CTDAh + Eluato 2 | 5.268  | 2.967  | 6.367  | 5.745  | 6.111  | 7.171  |



**Figura 2** – Resultados estatísticos que mostram: A, total de células marcadas por condição de cultivo; B, porcentagem de células em proliferação 24 h (marcadas com BrDU).

**Tabela 2** – Porcentagem de células marcadas com BrdU em proliferação celular (24 h)

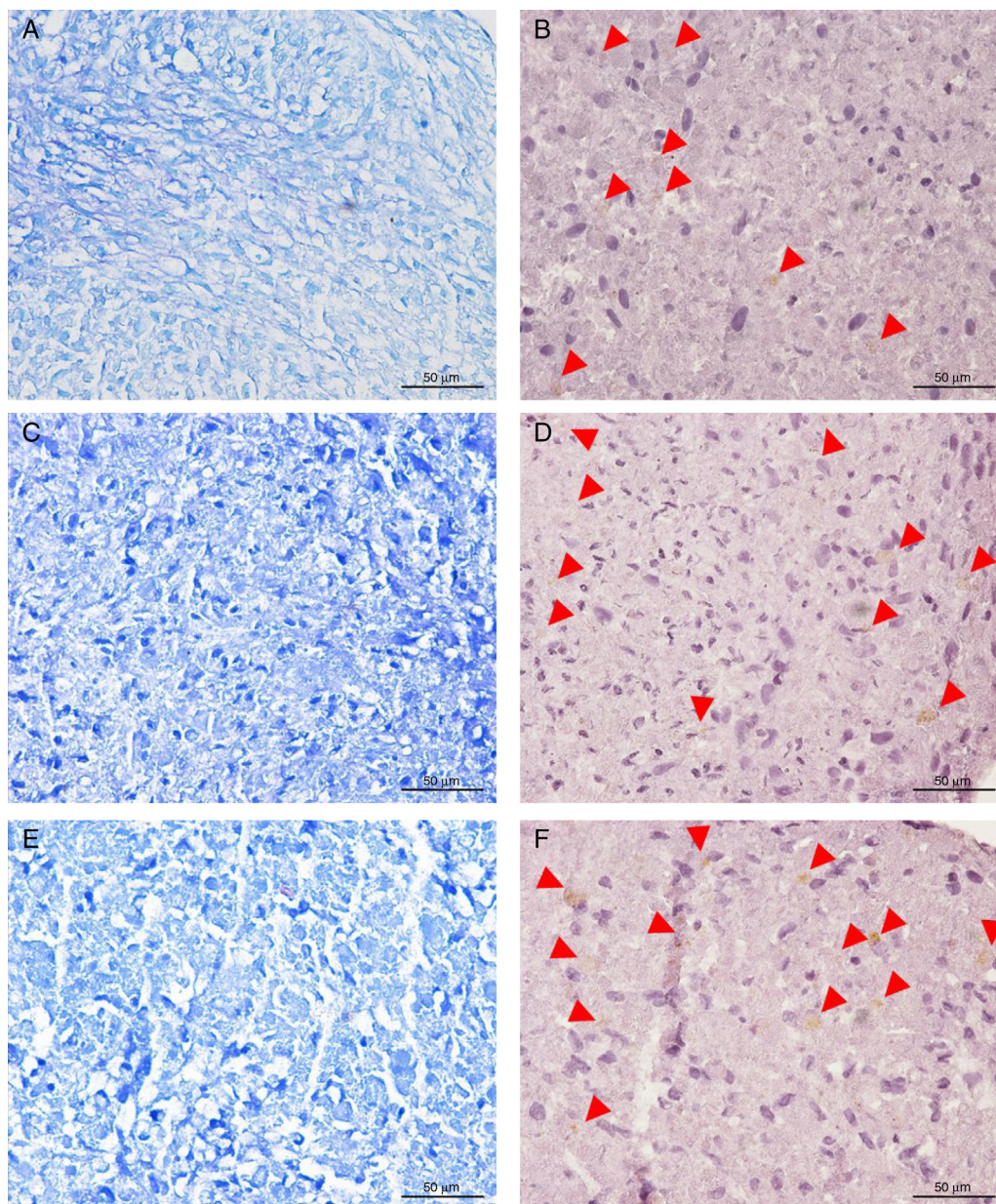
|                  | Poço 1 | Poço 2 | Poço 3 | Poço 4 | Poço 5 | Poço 6 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CTDAh            | 37     | 28     | 26     | 27     | 26     | 32     |
| CTDAh + Eluato 1 | 62     | 51     | 55     | ND     | 64     | 63     |
| CTDAh + Eluato 2 | 47     | 40     | 42     | 49     | 38     | 51     |

maior divisão celular, portanto, proliferação celular, quando as CTDAh estiveram em contato com o eluato de fibrina.

A análise microscópica das lâminas histológicas do ensaio de diferenciação condrogênica demonstrou que as três condições do ensaio (controle, meio de diferenciação comercial Gibco™ e eluato de fibrina) foram capazes de induzir a diferenciação das células-tronco em condrocitos.

É possível observar nas imagens microscópicas da [figura 3](#), em azul de touluidina, que as células cultivadas em meio

de diferenciação comercial e em eluato de fibrina apresentaram uma matriz extracelular mais organizada (C e E), com poucos espaços entre as células, em comparação com as células cultivadas somente com meio SFB (controle). As células do controle (A) têm uma matriz com bastante espaço entre as células e com coloração menos intensa do que os demais ensaios (meio diferenciação e eluato de fibrina), o que indica menor quantidade de mucopolissacarídeos na matriz extracelular. A coloração de azul de touluidina marca grupos ácidos



**Figura 3 – Avaliação microscópica do ensaio de diferenciação condrogênica: A, C e E, matriz extracelular evidenciada pela coloração com azul de toluidina, que mostra maior intensidade no meio de diferenciação e eluato; B, D e F, marcação em imunocitoquímica para aggrecana, proteína da MEC, expressa por células em diferenciação em condrócitos (setas). Aumento de 40x.**

de componentes celulares, como a região do núcleo celular, e tem afinidade por mucopolissacarídeos, encontrados na matriz extracelular cartilaginosa, como proteoglicanos e glicosaminoglicanos.<sup>11</sup>

A marcação imunocitoquímica para aggrecana sugere que todos os ensaios têm a glicoproteína expressa na matriz extracelular. A marcação é visualizada com pouca intensidade (setas em B, D e F), pois se trata de cultivo celular experimental de 21 dias. Na comparação das imagens, é possível identificar pontos que variam na tonalidade (de claro a médio) no citoplasma de várias células. As células do meio que contêm eluato tiveram expressão de aggrecana e mostraram o início

de diferenciação condrocítica confirmado pela coloração com azul de toluidina.

## Discussão

Depois de retirado o exsudado por compressão, obtiveram-se membranas com 3 cm<sup>2</sup> de área. Pode-se comprovar que a membrana de PRF tem textura e elasticidade suficientes para aplicações como biomaterial como sugerido por Khorshidi *et al.*<sup>15</sup>

Além dessas características físicas, Dohan *et al.*<sup>16</sup> demonstraram que, na membrana de PRF, depois da centrifugação,

as plaquetas são ativadas e os fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF, IGF) e citocinas liberados gradualmente. Durante esse processo ocorre uma reação intercelular entre a fibrina, as citocinas e a matriz extracelular do local envolvido. Dessa forma, o PRF progressivamente age na modulação de uma resposta inflamatória do tecido, tanto ao atrair novas células para regenerar o tecido adjacente como ao contribuir para a defesa contra bactérias e outros patógenos.<sup>17</sup>

Em um terceiro estudo, Dohan *et al.*,<sup>18</sup> investigaram quais citocinas estariam presentes na membrana de PRF. Foram encontrados citocinas de efeito pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4), assim como o fator de crescimento responsável pela angiogênese local (VEGF), o que resulta numa resposta eficiente contra a inflamação tecidual.

Gassling *et al.*<sup>10</sup> compararam o crescimento de células periosteas humanas em membranas de PRF com seu crescimento em membranas de colágeno comercial. O estudo avaliou a viabilidade celular, a biocompatibilidade por dosagem de desidrogenase láctica (LDH) e a proliferação celular por BrdU. Os resultados mostraram que ambas as membranas exibiam células viáveis e ausência de apoptose. Os testes com o BrdU indicaram maior proliferação celular nas membranas de PRF do que nas de colágeno, enquanto que os testes de MTT confirmaram maior atividade metabólica também para as membranas de fibrina.

Semelhantemente ao estudo anterior, Gassling *et al.*<sup>13</sup> propõem o uso de eluato da membrana de fibrina para cultivar osteoblastos. O estudo compara a compatibilidade e a proliferação celular entre as membranas de fibrina e de colágeno comercial. Os resultados mostraram maior proliferação celular por BrdU para a membrana de PRF, assim como maior diferenciação celular por teste de fosfatase alcalina.

No presente estudo foi observada diferença significativa de proliferação celular entre o grupo controle e os grupos de eluato, o eluato1 foi o grupo com maior quantidade de núcleos marcados em proliferação por BrdU. A diferença nos resultados sugere que o coágulo de fibrina pode variar, de acordo com o doador, na quantidade de plaquetas, citocinas e fatores de crescimento, que são fundamentais para o mecanismo celular de proliferação celular, uma vez que foram produzidas membranas de dois doadores.

A formação do coágulo de fibrina envolve uma lenta polimerização da fibrina no tubo, que resulta da coagulação feita por concentrações autólogas de trombina, que influenciam na estrutura tridimensional da malha de fibrina obtida. Dessa forma, a fibrina formada pode assumir duas arquiteturas distintas: tetramolecular condensada, com junções bilaterais, e trimolecular conectada, com junções equilaterais. O PRF com junções bilaterais é formado em altas concentrações de trombina, resulta em uma rede de fibrina muito rígida, que não favorece a passagem dos fatores de crescimento para meio celular. Por outro lado, em baixa concentração de trombina, a rede de fibrina formada com junções equilaterais é fina e flexível, facilita a infiltração dos fatores de crescimento e quimiotaxia de outras células para o local.<sup>16</sup>

Os resultados de proliferação celular em contato com PRF também são corroborados pelo estudo de Ehrenfest *et al.*,<sup>19</sup> que analisaram o seu efeito em cultura primária de diferentes tipos

celulares humanos (fibroblastos gengivais, pré-queratinócitos dermais, pré-adipócitos e osteoblastos maxilo-faciais), o que comprova a capacidade do PRF de induzir a proliferação de todos os tipos celulares, principalmente dos osteoblastos, e sugere que os fatores de crescimento promovem angiogênese, proliferação e diferenciação celular.

O uso de CTDAh derivadas de tecido adiposo mamário e PRF foi feito Xu *et al.*<sup>20</sup> Esses autores trataram as células-tronco com ginsenoside Rg1 (composto esterol extraído do ginseng) e com PRF. Ambos promoveram proliferação e diferenciação celular e foi observada a expressão de colágeno e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Durante a diferenciação condrogênica os condrócitos sintetizam a matriz extracelular, enquanto outros fatores de crescimento atuam sinergicamente para esse evento. Froelichet *et al.*<sup>21</sup> cultivaram CTDAh com um biomaterial composto de fibrina em gel e poliuretano e adicionaram fatores de crescimento TGF- $\beta$  e BMP-2 por 35 dias. O ensaio comprovou a capacidade das CTDAh de se diferenciar em condrócitos e de o compósito (fibrina + poliuretano) servir como arcabouço para o crescimento celular e ainda detectou a deposição da agregana e de glicosaminoglicana na matriz extracelular.

A diferenciação condrocítica também foi observada com o uso do plasma rico em plaquetas (PRP). Mishra *et al.*<sup>22</sup> observaram *in vitro* que o PRP tinha capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco em condrócitos, a partir do uso de marcadores de ciclo celular (Sox-9) e de componente estrutural da cartilagem articular (agrecana).

A influência do colágeno em cultivo de micromassa de células-tronco (CTMh) pré-diferenciadas em condrócitos foi estudada por Hui *et al.*<sup>23</sup> A partir de ensaios histológicos e imunocitoquímicos puderam verificar positividade de marcação em componentes da matriz extracelular da micromassa celular, como a GAG, colágeno tipo II e agregana altamente expressos pela célula. Esse achado corrobora os resultados histológicos e imunocitoquímicos deste trabalho, no qual a matriz extracelular foi intensamente marcada em azul de toluidina e em agregana, o que sugere que o eluato de fibrina induziu as células tronco a se diferenciarem em condrócitos.

Em um estudo de proliferação celular, Wu *et al.*<sup>24</sup> comprovaram que a membrana de PRF é capaz de diferenciar as células em osteoblastos, assim como regular a expressão das proteínas que sintetizam a matriz extracelular, o que resulta em um efeito de regeneração do tecido lesado.

---

## Conclusão

O método de extração da membrana de fibrina do sangue periférico, usado no presente trabalho, mostrou ser eficaz e as membranas foram produzidas com características estruturais semelhantes às descritas na literatura disponível. O protocolo experimental escolhido com o uso do eluato de membrana de fibrina em vez da própria membrana foi necessário para a visualização e contagem das células, impedida pela autofluorescência da membrana.

O cultivo das células-tronco derivadas de tecido adiposo com a adição do eluato da membrana de fibrina mostrou diferença significativa na proliferação celular em relação

ao grupo controle ( $p=0,002$  para o teste Anova com  $n=6$ ). Esse resultado mostra a capacidade da membrana de fibrina de favorecer a regeneração de tecidos. O pós-teste de Tukey revelou que houve diferença significativa entre o grupo CTDAh+Eluato 1 e os demais grupos (controle e CTDAh+Eluato 2) e que as condições fisiológicas dos participantes interferem nas propriedades do PRF.

O início da diferenciação condrocítica nos poços com o eluato de fibrina foi confirmado pela expressão de glicoproteínas presentes na matriz extracelular cartilaginosa visualizadas com os marcadores azul de toluidina e agregana. Portanto, a membrana de fibrina é capaz de induzir a diferenciação de células-tronco em condrócitos, favorece a regeneração do tecido cartilaginoso, principalmente quando usada na articulação danificada em conjunto com injeção dessas células.

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### REFERÊNCIAS

- Fuller R. Osteoartrose. In: Greve JMDA, editor. Tratado de medicina de reabilitação. São Paulo: Roca; 2007. p. 889–904.
- Myers KR, Sgaglione NA, Grande DA. Trends in biological joint resurfacing. *Bone Joint Res.* 2013;2(9):193–9.
- Betsch M, Schnependahl J, Thuns S, Herten M, Sager M, Jungbluth P, et al. Bone marrow aspiration concentrate and platelet rich plasma for osteochondral repair in a porcine osteochondral defect model. *PLoS One.* 2013;8(8):e71602.
- Pei M, He F, Li J, Tidwell JE, Jones AC, McDonough EB. Repair of large animal partial-thickness cartilage defects through intraarticular injection of matrix-rejuvenated synovium-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(9-10):1144–54.
- Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B. One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions: results at 2-year follow-up. *Cartilage.* 2011;2(3):286–99.
- Ge Z, Li C, Heng BC, Cao G, Yang Z. Functional biomaterials for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(9):2526–36.
- Fedorovich NE, Alblas J, Hennink WE, Oner FC, Dhert WJ. Organ printing: the future of bone regeneration? *Trends Biotechnol.* 2011;29(12):601–6.
- Del Corso M, Toffler M, Ehrenfest DM. Use of autologous leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) membrane in post-avulsion sites. *J Implant Adv Clin Dent.* 2010;1(9):27–35.
- Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 2010;81(4):546–55.
- Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Açil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):543–9.
- Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(7):901–13.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279–95.
- Gassling V, Hedderich J, Açil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(3):320–8.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e45–50.
- Khorshidi H, Raoofi S, Bagheri R, Banihashemi H. Comparison of the mechanical properties of early leukocyte- and platelet-rich fibrin versus PRGF/endoret membranes. *Int J Dent.* 2016;2016:1849207.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e37–44.
- Badade PS, Mahale SA, Panjwani AA, Vaidya PD, Warang AD. Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin. *Indian J Dent Res.* 2016;27(3):300–4.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e51–5.
- Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(3):341–52.
- Xu FT, Liang ZJ, Li HM, Peng QL, Huang MH, Li DQ, et al. Ginsenoside Rg1 and platelet-rich fibrin enhance human breast adipose-derived stem cell function for soft tissue regeneration. *Oncotarget.* 2016, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9360> [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27191987.
- Froelich K, Setiawan LE, Technau A, Tirado MR, Hackenberg S, Hagen R, et al. Influence of different growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in polyurethane-fibrin composites. *Int J Artif Organs.* 2012;35(12):1047–60.
- Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15(3):431–5.
- Hui TY, Cheung KM, Cheung WL, Chan D, Chan BP. In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials.* 2008;29(22):3201–12.
- Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent J.* 2012;57(2):207–12.