INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**SUBSTITUIÇÃO DOS COMPONENTES XENOBIÓTICOS
EMPREGADOS NO MEIO DE CULTURA PARA MANUTENÇÃO DE
QUERATINÓCITOS HUMANOS, POR SIMILARES DE ORIGEM
HUMANA**

SILVANA CEREIJIDO ALTRAN

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:

Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo
2011

Dedico este trabalho às minhas maiores referências de mestres, tanto na profissão quanto na vida, meus pais: Celia Cereijido Altran e Oswaldo Altran Martins (*in memoriam*), por serem minha fonte de motivação e pela conduta que fez com que meus irmãos e eu fôssemos quem somos hoje.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Monica Beatriz Mathor pela dedicação, paciência e principalmente por orientar-me, no real sentido da palavra, de modo que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao Dr. Cesar Isaac, pela co-orientação, apoio, incentivo, por compreender minhas longas ausências do laboratório e pelas “dicas” e conselhos, sempre de grande valia.

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira, por permitir que as instalações do Laboratório de Cultura Celular (LIM 04/FMUSP) fossem utilizadas em parte da execução deste trabalho.

À Dra. Marisa Roma Herson, por ter me recebido de braços abertos no laboratório, pelos preciosos ensinamentos e por ter sido grande incentivadora ao meu ingresso no curso de pós-graduação.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e à Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), pela acolhida e por proporcionar-me condições para a execução deste trabalho.

Aos demais alunos do curso de pós-graduação lotados no IPEN, “companheiros de batalha”: Antônio Carlos Martinho Jr, Bianca Sufi, Fabiana de Andrade Bringel, Maria Fátima G. Klingbeil, Fernando A. N. Soares, Natália Mencacci, Rodrigo Mosca e Stefany P. Santin pela ajuda, e especialmente a Daniele Yoshito, com quem compartilhei as responsabilidades da execução deste trabalho.

A Felipe Daltoé e Rodrigo Vieira pelo pronto apoio em momentos de dificuldades.

Aos alunos de pós-graduação da FMUSP, também “companheiros de batalha”: André O. Paggiaro e Elisabeth Hosaka, com quem sempre pude contar quando precisei.

À Dra. Andrea C. D. Rodas e à Dra. Patrícia S. Lopes, por transmitirem seus conhecimentos e pela solicitude de sempre.

À Dra. Olga Z. Higa, por permitir a utilização do espectrofotômetro com multidetectores, de grande importância para a conclusão deste estudo.

Aos secretários Arlete Correia, Cláudia R. Nolla, Marcos C. da Silva e Rute Batista, pelo suporte constante.

Ao Dr. Daniel Granato e ao Dr. Diógenes de Souza Bido, pela análise estatística feita neste trabalho.

Aos engenheiros Carlos Garcia e Elisabeth Somessari pela irradiação das células, pela esterilização dos materiais e por nos atenderem sempre com simpatia e carinho.

À Comissão de Pós-Graduação do IPEN pela atenção dispensada aos pós-graduandos.

À Renata Oliveira da Conceição, por ser “meu braço direito” nas rotinas do laboratório, pela amizade, pelos conselhos e pelas palavras que por inúmeras vezes me confortaram.

À Luciana Meneghelli que, mesmo fisicamente distante, permanece sendo exemplo de dedicação e persistência que procuro seguir.

À Roqueline Alves Lago, que executou com dedicação tarefas fundamentais para a realização deste trabalho, por se lembrar de mim em suas orações e principalmente pela amizade dedicada ao longo de todos esses anos.

À Maria Aparecida Moreira (*in memoriam*), que além de saudades, deixou em mim profundos sentimentos de gratidão, admiração e respeito. A você, Maria, pela pessoa cativante, bondosa e amiga que foi; minha eterna gratidão.

À Silvana Biagioni, por ter ajudado a “espantar” momentos de tensão com sua espontaneidade e simpatia.

À Edna Maria Rodrigues, por me fazer acreditar em minha própria capacidade.

Ao Bruno Valério que, mesmo com seu “jeitinho” reservado, ficou “na torcida” para que este trabalho fosse finalizado com sucesso.

Aos ex-funcionários do LIM 04 que, de certa forma, também têm uma parcela de contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus lindos sobrinhos: Bruno, Rafael, Victor e Karine, por tornarem meus dias mais alegres.

À Nezinha, por zelar por minha casa e família, da qual também faz parte.

Aos meus irmãos: Simone, Sandra e José, pela preocupação e apoio constantes.

Aos meus tios, cunhados e primos pela torcida e por compreenderem minhas ausências - que não foram poucas - nos momentos de reuniões familiares.

Às minhas amigas de longa data: Carol e Marília, por compartilharem de todos os momentos importantes da minha vida. Este é mais um deles, obrigada pelo incentivo.

Ao meu amigo José Vicente pela torcida, por me incluir em suas orações e por estar sempre preocupado com meu bem estar.

Ao Banco de Tecidos (HC/FMUSP) pela doação dos tecidos necessários para realização deste estudo, e aos seus funcionários Catarina, Eugênio e Izabel, pelo companheirismo.

Ao Dr Cyrillo C. Filho, médico assistente da Fundação Zerbini – Instituto do Coração/HCFMUSP, e a toda sua equipe pela doação de bolsas de concentrado de plaquetas e por todo carinho dedicado ao nosso grupo.

Aos doadores dos materiais biológicos para pesquisa, itens fundamentais para a execução deste trabalho.

SUBSTITUIÇÃO DOS COMPONENTES XENOBIÓTICOS, EMPREGADOS NO MEIO DE CULTURA PARA MANUTENÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS, POR SIMILARES HUMANOS

Silvana Cereijido Altran

RESUMO

Epitélios confluentes de queratinócitos autólogos, cultivados segundo metodologia padronizada por Rheinwald e Green em 1975, têm sido usados como enxertos em diferentes situações clínicas. Contudo, a presença de componentes xenobióticos empregados nesta metodologia implica na possibilidade de transmissão de zoonoses, príons e viroses aos pacientes, além de envolver questões éticas relacionadas à utilização de animais. Tais preocupações têm direcionado pesquisadores a buscar alternativas que superem este impasse; no entanto, as formulações obtidas até o momento não são completamente satisfatórias. Assim, nossa proposta neste estudo, foi omitir ou substituir os componentes xenobióticos tradicionalmente utilizados no meio para queratinócitos, por similares humanos. Como resultado, padronizamos um meio de cultura onde omitimos o emprego de toxina colérica, substituímos o soro fetal bovino por lisado de plaquetas humanas na concentração de 2,5% e a insulina de origem bovina foi substituída por insulina recombinante humana na mesma concentração do método original (5 µg/mL). Com os resultados obtidos foi possível concluir ser viável o cultivo de queratinócitos humanos, mantidos em meio de cultura livre de componentes xenobióticos.

REPLACEMENT OF XENOBIOTIC COMPONENTS, APPLIED IN THE CULTURE MEDIUM FOR MAINTENANCE OF HUMAN KERANOCYTES, BY HUMAN SIMILAR

Silvana Cereijido Altran

ABSTRACT

Confluent epithelia of autologous keratinocytes, cultivated according to standardized methodology by Rheinwald and Green in 1975, have been used as grafts in different clinical situations. However, the presence of xenobiotics components applied in this method implies the possibility of transmission of zoonoses, prions, and viruses to patients, besides involving ethical issues related to the use of animals for components obtainment. Such concerns have driven researchers to seek alternatives that overcome this deadlock, as the formulations obtained so far are not completely satisfactory. Thus, our proposal in this study was to omit or replace the xenobiotics components traditionally used in the medium to keratinocytes culture, by human similar. As a result, we have standardized a culture medium whereby we omitted the use of cholera toxin, replaced fetal bovine serum by human platelet lysate at a 2.5% concentration and bovine insulin was replaced by recombinant human insulin at the same concentration as the original method (5 µg/mL). With the results obtained we could conclude that the method to be viable to cultivate human keratinocytes, kept in culture medium free of xenobiotics components.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- ADP – adenosine difosfato
- Ala - alanina
- Arg – arginina
- ANOVA – análise de variância
- Asn – asparagina
- Asp – aspartato
- ATCC – American Type Culture Collection
- bFGF – fator básico de crescimento para fibroblasto
- CØ – meio controle sem soro
- cAMP – AMP (adenosine monofosfato) cíclico
- CAPM– cininogênio de alto peso molecular
- cDNA – DNA (ácido desoxcomplementar
- CAPPesq/HC-FMUSP –Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa/ Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- CCL-92 – linhagem celular de fibroblastos murinos
- cm – centímetro (1×10^{-2} m)
- COEP/FSPUSP – Comitê de Ética e Pesquisa
- Cys – cisteína
- DMEM – Dulbecco's Modifeid Eagle Medium (meio de cultura)
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- EEB – encefalopatia espongiforme bovina (*doença de vaca louca*)
- EFC – eficiência de formação de colônias
- EGF – fator de crescimento epidermal
- ELISA – ensaio imunoenzimático
- F12 – F12 nutrient mixture (meio de cultura)
- Gln – glutamine
- Glu – glutamate
- Gly – glicina
- Gp – glicoproteínas
- Gy - gray
- His – histidina
- HTL – vírus linfotróficos de células T humanas
- ICHC – Instituto Central do Hospital das Clínicas
- IFE – epiderme interfolicular
- IGF – fator de crescimento semelhante a insulina
- Ile – isoleucina
- K+ - nomenclatura adotada em nosso laboratório, para designar meio de cultura tradicionalmente utilizado para a cultura de queratinócitos e empregado como controle neste trabalho
- kDa – kilodaltons
- LPA – lisado de plaquetas, método de prepare A
- LPB – lisado de plaquetas, método de preparo B
- LPC – lisado de plaquetas, método de preparo C

- Leu – leucina
- LMWH – heparina de baixo peso molecular
- LP – lisado de plaquetas
- Lys – lisina
- Met – metionina
- mL – mililitros (1×10^{-3} L)
- mM – millimolar (1×10^{-3} M)
- MTS – composto tetrazólico, reduzido pela atividade de enzimas mitocondriais, a um produto formazan, cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis em cultura
- μ g – nanograma (1×10^{-6} g)
- μ m – nanômetro (1×10^{-6} m)
- μ M – nanomolar (1×10^{-6} M)
- ng – nanograma (1×10^{-9} g)
- nm – nanômetro (1×10^{-9} m)
- nM – nanomolar (1×10^{-9} M)
- PDF – produtos de degradação da fibrina
- PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
- PF-4 – fator plaquetário 4
- PH – potencial de hidrogênio
- Phe – fenilalanina
- pM – picomolar (1×10^{-12} M)
- PMS – fenazina metasulfato
- Pro – prolina
- PRP – plasma rico em plaquetas
- PVDF – fluoreto de polivinilideno
- Ser – serina
- SFB – soro fetal bovino
- SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida
- T_3 – triiodotironina
- TGF – β – fator de transformação do crescimento β
- Thr – treonina
- tPA – ativador do plasminogênio tecidual
- Trp – triptofano
- TXA_2 – tromboxano A_2
- Tyr – tirosina
- UFH – heparina não fracionada
- UI – unidade internacional
- Val – valina
- VC – viabilidade celular
- vWF – fator von Willebrand

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO.....	14
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
3.1	Pele.....	15
3.1.1	Epiderme	15
3.1.2	Junção dermo-epidérmica	23
3.1.3	Derme	26
3.1.4	Hipoderme.....	28
3.2	Meio de cultura e seus suplementos tradicionais	28
3.2.1	Hidrocortisona	29
3.2.2	Toxina colérica.....	29
3.2.3	Fator de crescimento epidermal (EGF)	29
3.2.4	Insulina	30
3.2.5	Triiodotironina (T3)	30
3.2.6	Adenina	30
3.2.7	Glutamina.....	30
3.2.8	Antibióticos-antimicóticos.....	30
3.2.9	Soro Fetal Bovino.....	31
3.3	Plaquetas.....	32
3.3.1	Hemostasia	35
3.3.2	Mecanismos de ação da heparina	39
3.3.3	Lisado de plaquetas	40
3.4	Camada de Sustentação (Feeder layer)	41
3.5	Testes de viabilidade celular	43
3.5.1	Eficiência de formação de colônias.....	43
3.5.2	Avaliação do tempo de vida celular em cultura (<i>Life span</i>)	44
3.5.3	Ensaio MTS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46

4.1	Obtenção dos materiais biológicos.....	46
4.2	Descarte de material biológico.....	46
4.3	Preparo dos lisados de plaquetas.....	46
4.3.1	Lisado para o teste de heparina	46
4.3.2	Lisado para o teste do tipo sanguíneo	47
4.4	Preparo dos meios de cultura para obtenção, propagação e utilização dos queratinócitos humanos	48
4.5	Obtenção de queratinócitos humanos	48
4.6	Preparo e testes dos diferentes meios de cultura	50
4.6.1	Teste de adição de heparina.....	50
4.6.2	Testes de substituição da insulina e omissão da toxina colérica	51
4.6.3	Teste de variação da concentração de T ₃	51
4.6.4	Teste de influência do tipo sanguíneo	52
4.6.5	<i>Teste de concentração dos lisados e de privação de EGF em culturas de baixa densidade</i>	<i>52</i>
4.6.6	Teste de privação da toxina colérica por 1 e 2 passagens de culturas em baixa densidade.....	53
4.7	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Teste da determinação do momento da adição de heparina no preparo do lisado de plaquetas.....	55
5.2	Teste da determinação do tipo e concentração do lisado em culturas em alta densidade ..	56
5.3	Teste de substituição da insulina bovina por insulina recombinante humana	58
5.3.1	Teste de variação na concentração de T ₃	61
5.4	Teste de omissão da toxina colérica.....	62
5.5	Teste de influência do tipo sanguíneo	64
5.6	Teste de concentração dos lisados em culturas em baixa densidade e de privação do EGF	66
5.7	Teste de privação da toxina colérica por 1 e 2 passagens de culturas em baixa densidade	69
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	79
	ANEXO A.....	80
	ANEXO B.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

A pele não é apenas o maior órgão do corpo humano^{1,2}, medindo de 1,5 a 2 m² em um adulto de estatura média, ela é também um órgão multifuncional³ de importância fundamental para a homeostase do organismo⁴. Por essas razões, danos que comprometam a sua integridade, como úlceras e queimaduras, são motivos de grande preocupação médica e torna a cobertura dessas soluções de continuidade uma medida premente. O recurso mais utilizado neste sentido é o enxerto autógeno de pele. Quando esta enxertia não for suficiente, quer pela extensão da perda, quer pelas características das áreas doadoras e/ou receptoras, substitutos dermo-epidérmicos, obtidos a partir de células cultivadas *in vitro*, podem ser utilizados⁵.

Graças a padronização de uma metodologia eficaz para a obtenção e cultivo de queratinócitos, publicada por Rheinwald e Green em 1975, hoje é possível obter camadas confluentes destas células, com o propósito de formar epitélios *in vitro*, para serem utilizados como enxertos autógenos^{6,7}.

Resumidamente, esta metodologia consiste em semear células desagregadas do tecido, por meio de ação enzimática (tripsina), sobre uma camada de sustentação (*feeder layer*) composta por fibroblastos murinos de linhagem 3T3, após estes terem a taxa de proliferação controlada pela ação de radiação ionizante ou de drogas anticancerígenas, como a Mitomicina C^{6,7,8}. O meio de cultura empregado nesta metodologia, para a preservação e proliferação de queratinócitos, é composto por nutrientes e fatores adicionais que atuam como mitógenos ou inibidores da diferenciação celular⁸ como: meios nutricionais quimicamente definidos, glutamina, fator de crescimento epidermal (EGF), toxina colérica, hidrocortisona, insulina (de origem bovina), triiodotironina (T3), adenina e soro fetal bovino (SFB).

Com suas características peculiares, o método de cultivo proposto por Rheinwald e Green^{6,7} abriu caminho para que, a partir do início da década de 1980⁹, epitélios cultivados desta maneira, fossem usados com propósito terapêutico. E assim, por vários anos, a literatura descreve a sua aplicação no tratamento de queimaduras^{4,10,11}, úlceras crônicas¹¹ epidermólise bolhosa^{4,10}, fechamento de áreas cruentas resultantes da remoção de nevus gigante^{4,10},

tatuagens¹⁰, revestimento de áreas doadoras de retalho^{4,11} entre outras aplicações. Até que, na década de 1990, aumentou a preocupação, por parte dos médicos, acerca da possibilidade de transmissão, aos pacientes, de doenças causadas por patógenos contidos em células e materiais empregados no método de cultivo dessas e de outras células destinadas a fins clínicos; como por exemplo: viroses animais¹², zoonoses¹² e Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)⁹. Isso sem contar com as questões éticas que envolvem a utilização de animais, já que a obtenção do soro fetal, por exemplo, é feita através da punção cardíaca do feto bovino¹³.

Tais preocupações, impulsionaram pesquisadores e indústrias a buscar alternativas aos componentes xenobióticosⁱ empregados no cultivo de células humanas, focando sua atenção, principalmente sobre o soro fetal bovino, por ser ele uma fonte de nutrientes presente no meio de cultura de vários tipos celulares^{13,14}.

Produtos derivados de plaquetas tem apresentado interesse clínico como substitutos do soro fetal bovino¹⁵; pois plaquetas carregam dentro de si, grânulos α contendo citocinas e diversos fatores de crescimento envolvidos na reparação tissular^{16,17}. Alternativas disponíveis hoje no mercado, como os meios que dispensam o uso de soro, não atendem ao propósito de cultivar células visando a aplicação clínica, por não terem sido aprovados para esta finalidade ou ainda por conterem outros componentes de origem animal como albumina, transferrina ou extrato pituitário de origem bovina¹⁸.

Tal fato despertou nosso interesse na obtenção de uma cultura de células da pele humana adequada à utilização clínica; o que implica não só na substituição do soro fetal bovino por lisado de plaquetas humanas, mas também na omissão ou substituição de outros componentes.

ⁱ NA: proveniente de indivíduos geneticamente diferentes e de espécie distinta

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo, verificar a possibilidade de substituir os componentes xenobióticos, empregados no meio de cultura para manutenção e propagação de queratinócitos *in vitro*, semeados em baixa ou alta densidade (com ou sem camada de sustentação, respectivamente), por similares de origem humana. Para tanto, foram testadas as seguintes modificações:

- * Substituição do soro fetal bovino, por lisado de plaquetas humanas, após padronização da obtenção do mesmo e avaliação da interferência dos diversos tipos sanguíneos,
- * Substituição da insulina bovina, por insulina recombinante humana,
- * Omissão da toxina colérica.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 *Pele*

A pele é o maior órgão do corpo humano^{1,2}, correspondendo a 16% de seu peso¹⁹ e desempenha diversos papéis, tais como³:

Na condição de barreira física²⁰, sua função é proteger o organismo contra agressões externas^{1,2} protegendo-o contra o atrito²¹ e a invasão de patógenos^{1,2,20,22}, absorvendo e bloqueando radiações^{1,2} e evitando a perda excessiva de água^{1,2,20,21}.

Como órgão sensorial²⁰, ela possui estruturas que permitem a percepção de estímulos como dor, pressão, tato e temperatura^{20,22}. Além disso, a pele sedia a formação de vitamina D^{20,21,22} e responde pela regulação térmica, graças à presença de pêlos e tecido adiposo subcutâneo, que previnem a perda de calor, e de glândulas sudoríparas, que participam da excreção de diversas substâncias^{20, 21,22}.

Estruturalmente, a pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica (epiderme) e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica (derme)²¹, cada qual com os seus tipos celulares e funções específicas¹, estando limitadas entre si pela presença de uma junção dermo-epidérmica.

3.1.1 **Epiderme**

A epiderme – camada mais externa da pele - compreende um epitélio multiestratificado conhecido como epiderme interfolicular (IFE), folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas associadas²³. De origem ectodérmica²¹, a epiderme não é diretamente vascularizada¹⁰ e abriga predominantemente (aproximadamente 85%) um tipo celular, o queratinócito, encontrando-se este em diversos estágios de diferenciação²⁴.

Sob o ponto de vista cinético, os queratinócitos da epiderme podem ser divididos em 3 sub-populações distintas, distribuídas em 2 compartimentos - as células tronco (CT) localizadas na camada basal e as células de amplificação

transitória (AT) localizadas na camada basal e algumas vezes na camada supra-basal, compreendem o compartimento proliferativo, enquanto as células pós-mitóticas (PM), localizadas na camada espinhosa superior, granulosa e córnea, compreendem o compartimento de diferenciação^{25,26,27}.

No compartimento proliferativo, as células tronco (CT) se dividem com pouca frequência; quando isso ocorre elas podem dar origem tanto a outras células tronco (SC) quanto a células de amplificação transitória (AT)²⁷ que apesar de se dividirem com maior frequência, tem uma capacidade limitada para a divisão antes de deixarem o compartimento proliferativo, tornando-se PM ou terminalmente diferenciadas, em um esquema “CT→AT→PM”^{25,26}.

No compartimento de diferenciação, as células pós- mitóticas iniciam sua jornada em direção a superfície da pele, passando por uma série de alterações bioquímicas e morfológicas que culminam na produção de células mortas, achatadas e sem núcleo: as células córneas²⁸. Estas células, apesar de mortas, impedem o ressecamento da pele, fornecem resistência às lesões químicas e físicas e resistem aos ataques dos microorganismos²².

O processo de diferenciação envolve:

- ✓ Perda da capacidade mitótica
- ✓ Síntese de novas proteínas estruturais e a modificação das já existentes
- ✓ Aparecimento de novas organelas celulares, reorganização estrutural daquelas presentes e a eventual perda de todas as organelas da célula
- ✓ Aumento no tamanho da célula e o achatamento de sua forma
- ✓ Mudança progressiva de um metabolismo celular generalizado para um metabolismo mais focado, associado à síntese de moléculas relacionadas à queratinização e uma degradação coordenada das organelas celulares
- ✓ Alterações nas propriedades da membrana plasmática, antígenos de superfície celular e receptores
- ✓ Desidratação

Este processo ocorre ao longo das 4 ou 5 camadas da pele, nomeadas de acordo com a morfologia e as propriedades funcionais e estruturais em que as células se encontram ¹ (FIG. 1):

FIGURA 1 - Maior aumento LM da epiderme de pele grossa (SB) = camada basal, (SS) = camada espinhosa, (SG) = camada granulosa, (SC) = camada córnea. Parte da derme subjacente aparece no fundo (575 x) HE ²⁹.

- **Camada basal:** constituída por uma camada de células cubóides ou cilíndricas ^{3,19,20} proliferativas apoiadas sobre uma membrana basal que por sua vez é sustentada pela derme, formando com ela uma interface irregular ¹⁹. Essas células são repletas de filamentos de queratina, organizados em feixes ao redor do núcleo e conectando hemidesmossomos (junção entre células basais e lâmina basal) e desmossomos (junção entre queratinócitos adjacentes) ^{1,2}.

A regulação da proliferação das células basais está sujeita a uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os reguladores extrínsecos incluem o substrato extracelular, fatores de crescimento e hormônios; dos reguladores intrínsecos fazem parte fatores específicos produzidos localmente, que causam efeitos autócrinos ou parácrinos, e nucleotídeos cíclicos ².

- **Camada espinhosa:** é formada por 5 ou 6 fileiras de células poligonais ³, sendo que as mitoticamente ativas são aquelas situadas na região mais inferior desta camada ¹⁹. O núcleo proeminente e a basofilia citoplasmática indicam uma síntese protéica ativa. Uma proteína fibrilar, a citoqueratina, produto de síntese predominante dessas células, se agrega para formar fibrilas intracelulares conhecidas como tonofibrilas ²⁰.

Morfologicamente, as células da camada espinhosa são mais largas e planas do que as células da camada basal e apresentam um grande número de desmossomos que as unem entre si, conferindo a esta camada um aspecto histológico semelhante a uma espinha, característica peculiar que lhe conferiu este nome².

- **Camada granulosa:** é assim conhecida pelo fato de suas células poligonais e com núcleo central²¹ conterem grânulos elétron-densos de querato-hialina. Estes grânulos, que não são envolvidos por membrana, apresentam formato irregular¹⁹ e estão estreitamente associados aos tonofilamentos que o atravessam³.

Grânulos revestidos por membrana lipídica, também estão presentes nesta camada. Estes unem-se a membrana plasmática e liberam seu conteúdo lipídico nos espaços intercelulares, impedindo a passagem de compostos, inclusive água, entre células adjacentes²¹.

As células da camada granulosa contêm todas as organelas e atividades tipicamente associadas com a função metabólica celular intacta, indicando que elas permanecem vivas, ainda que estejam se aproximando da etapa final da queratinização^{1,2}.

- **Camada lúcida:** constituída por uma delgada camada de células, situada superficialmente à camada granulosa apenas na epiderme da pele espessa, como as palmas das mãos e plantas dos pés¹⁹. As células da camada lúcida são claras, homogêneas e não apresentam núcleo nem organelas^{19,21}. Por outro lado, elas apresentam filamentos de queratina densamente compactados, dispostos paralelamente à superfície da pele e eleidina, um produto da transformação da querato-hialina¹⁹. O espessamento da face citoplasmática da membrana plasmática deve-se à deposição de involucrina¹⁹. A presença de desmossomos entre as células, ainda pode ser observada²¹.
- **Zona de transição:** entre as camadas granular e córnea, alguns autores consideram a existência de uma zona de transição entre a epiderme viva e a

“morta”. Essa zona é uma região de intensa atividade metabólica e reestruturação celular. É nessa região que todas as organelas celulares são destruídas pela ação de proteases, Dnase, Rnase, hidrolases ácidas e ativadores de plaminogênio. Simultaneamente, os grânulos lamelares fundem-se com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo lipídico no espaço extracelular. Após a liberação, esses lipídeos são extensivamente remodelados para a formação de lençóis ricos em lipídeos. Tais lençóis são extremamente importantes na “impermeabilidade” da epiderme. É também nesta região que os filamentos de queratina são reestruturados e que os envelopes cornificados são formados².

- **Camada córnea:** as células córneas representam o ponto final do processo de diferenciação dos queratinócitos. Durante a transição da camada granular para a camada córnea, o queratinócito perde cerca de 70% de seu peso seco² torna-se um poliedro achatado, intensamente queratinizado e com membrana plasmática espessa^{3,19}.

As células cornificadas não apresentam núcleo e organelas, mas são preenchidas com filamentos de citoqueratina embebidos em uma matriz amorfa. As células mais distantes da superfície da pele apresentam desmossomos, enquanto as células próximas à superfície da pele, denominadas escamas, ou células córneas, perdem seus desmossomos e tornam-se descamadas¹⁹.

Outras células sem participação direta na organização do tecido¹⁰ também estão presentes, como: melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele), células de Langerhans (com função imunológica) e células de Merkel (componentes do sistema nervoso)⁴.

3.1.1.1 Outras células presentes na epiderme

- **Células de Langerhans:** São células dendríticas derivadas de células-fonte hematopoéticas situadas na medula óssea³⁰. Elas correspondem de 2% a

4%^{3,19} da população de células epidermais e estão dispersas, principalmente, entre os queratinócitos da camada espinhosa³⁰.

Apesar do núcleo com contorno irregular e a ausência de tonofilamentos permitirem a distinção entre essas células e os queratinócitos circunjacentes, a principal característica ultra-estrutural das células de Langerhans é a presença de grânulos envolvidos por membrana, que se assemelham a uma raquete de pingue-pongue e são denominados grânulos de Birbeck^{19,31}.

Embora as células de Langerhans sejam capazes de realizar mitose, esta atividade é restrita; portanto, elas são substituídas continuamente por células precursoras que deixam a corrente sanguínea, migram para a epiderme e diferenciam-se em células de Langerhans¹⁹.

Como células apresentadoras de antígenos^{19,30,31}, as células de Langerhans comportam-se como macrófagos epidermais quanto a capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T, mas não tem a capacidade fagocitária dos mesmos³¹.

- **Células de Merkel:** Estas células estão irregularmente dispersas entre os queratinócitos da camada basal^{1,3,19,20} e são especialmente abundantes nas pontas dos dedos, na mucosa oral e na base dos folículos pilosos^{1,19}. Elas possuem núcleo lobulado e projetam “espinhos” citoplasmáticos em direção aos queratinócitos, que deformam seu contorno e juntam-se a elas através de desmossomos¹. Graças a essa integração e morfologia, as células de Merkel registram a mais leve modificação da estrutura epidérmica transmitindo esta informação às terminações nervosas, com as quais estão relacionadas³.
- **Melanócitos:** Os melanócitos são células derivadas das cristas neurais¹ com a incumbência de síntese e liberação de melanina, um pigmento castanho que é o principal responsável pela coloração da pele²⁰. Eles correspondem a 13% da população celular da epiderme³ e encontram-se intercalados entre os

queratinócitos da camada basal em intervalos não específicos¹, embora seja conhecida uma relação específica entre eles, de aproximadamente 1:36³².

Morfológicamente, os melanócitos apresentam um corpo celular globoso de onde se destacam múltiplos prolongamentos que penetram nos espaços intercelulares da camada espinhosa^{1,3}. O seu núcleo é arredondado, apresentando uma cromatina fina e um nucléolo bem visível³. A característica diferencial dos melanócitos fica por conta da presença de melanossomas no citoplasma dessas células^{1,20}. Os melanossomas são estruturas ovóides limitadas por membrana onde ocorre uma série de reações mediadas por receptores, estimuladas por hormônios e catalisadas por enzimas, que resultam na produção de melanina¹.

Os melanossomas presentes no corpo celular dos melanócitos são mobilizados até as pontas de seus longos prolongamentos¹⁹. Então, os dendritos melanocitários penetram no citoplasma das células da camada espinhosa, a conexão entre o dendrito e sua célula é interrompida e o conteúdo dendritico é internalizado no citoplasma do queratinócito^{19,30}. Uma vez no queratinócito, os melanossomas são transportados para a região supra nuclear, de modo que estabeleçam uma barreira protetora entre o núcleo e os raios ultravioletas emitidos com os raios solares. Finalmente, a melanina é atacada e degradada pelos lisossomos dos queratinócitos, em um processo que ocorre por um período de vários dias¹⁹.

3.1.1.2 Anexos cutâneos

Os principais anexos ligados à pele são:

- **Pêlos:** Os pêlos são estruturas queratinizadas e filamentosas que se projetam da superfície da pele¹⁹. Eles se localizam em uma invaginação da epiderme na derme, originando-se a partir de células-mãe localizadas na epiderme que envolve o bulbo capilar^{3,19,33}.
- **Glândulas sudoríparas:** As glândulas sudoríparas presentes nos mamíferos podem ser de dois tipos: apócrinas e écrinas^{19,20,22}. As apócrinas

estão localizadas na derme mais profunda, sempre associadas a um folículo pilosebáceo: seu canal se abre no funil folicular acima do canal excretor da glândula sebácea³. As células mioepiteliais que envolvem a porção secretora das glândulas apócrinas auxiliam na expulsão do produto de secreção do ducto da glândula¹⁹. Enquanto as écrinas estão distribuídas em toda a superfície do corpo, salvo unhas e lábios³, e atravessam a derme e a epiderme, se abrindo na superfície da pele através de um poro sudoríparo^{3,19}.

- **Glândulas sebáceas:** Com exceção das palmas das mãos e plantas dos pés, as glândulas sebáceas são encontradas por todo o corpo^{3,19}, localizadas na derme. Seus ductos desembocam no terço superior dos folículos pilosos^{19,21}.
- **Unhas:** A unha é constituída por placas de células epiteliais altamente queratinizadas e compactadas, estando localizadas na superfície dorsal dos dedos^{3,19,21}.

3.1.1.3 Componentes Estruturais da Epiderme

- **Queratina:** A natureza da queratina é fundamental para a função protetora da pele. A mistura de queratinas na camada córnea fornece uma excelente cobertura adaptada para os tecidos subjacentes, sendo ela não reativa quimicamente, dura e à prova d'água, além de elástica e resistente à abrasão e insultos físicos³. Na pele encontram-se quase 50 tipos de queratinas²⁹ que variam em massa molecular 40-70 kDa, e com valores de PH isoelétrico variando de 5 a 8. Elas podem ser agrupadas nas classes “tipo I” e “tipo II”, com base no PH isoelétrico, imuno-reatividade, massa molecular, hibridização com cDNAs, modo de expressão e capacidade de pares. Pelo menos um tipo representativo de cada classe I e II está presente em todas as células epiteliais, e um membro de cada classe é absolutamente necessário para a formação de uma matriz tridimensional de filamentos que

se estendem do núcleo para a membrana celular². Esses filamentos funcionam como estruturas resistentes às tensões dentro das células epiteliais e são críticas para a manutenção da forma e viabilidade celular. Na ausência de pares de queratina adequados, as moléculas de proteínas ficam instáveis e suscetíveis à degradação por enzimas degradadoras de proteínas (proteases)³⁴.

- **Tonofilamentos:** Os tonofilamentos são proteínas fibrosas sintetizadas pelos ribossomos, podendo ser observados como longos filamentos com diâmetro de aproximadamente 8 nm³⁵. Pertencentes a uma classe de filamentos intermediários, os tonofilamentos não correspondem apenas ao aspecto ultra-estrutural mais característico do epitélio escamoso estratificado, mas também ao componente citoplasmático mais abundante e ao maior elemento estrutural desse tecido³⁶. Os tonofilamentos que tem a queratina como um importante constituinte bioquímico^{29,37}, estão presentes em todas as camadas da epiderme e agrupam-se em feixes formando as tonofibrilas. Estas tornam-se cada vez mais densas à medida que se direcionam para camada córnea onde constituirão, por fim, as fibras de queratina da célula córnea³.
- **Querato-hialina:** Os grânulos de querato-hialina são estruturas irregulares, elétron-densa, não envolvidas por membranas e com diâmetro entre 100-150 nm²⁹ que podem ser observados como grânulos isolados na porção superior da camada espinhosa e mais abundantemente na camada granulosa³⁸. Eles estão intimamente associados com os tonofilamentos que os circundam e suportam os ribossomos naquelas regiões periféricas onde os tonofilamentos estão ausentes³⁶. A associação dos grânulos com os ribossomos sugere que eles sejam sintetizados por essas organelas³⁶.

3.1.2 Junção dermo-epidérmica

A junção dermo-epidérmica, também chamada por alguns autores de membrana basal^{19,39} é uma estrutura dinâmica sob remodelação constante que

forma uma interface contínua entre a derme e a epiderme, separando essas duas unidades tanto sob o ponto de vista físico quanto funcional^{1,40}. A ela cabem diversas funções fundamentais que incluem: o suporte e adesão das células epidermais; regulação do transporte nutricional entre derme e epiderme e o controle da organização e desenvolvimento epidermal^{40, 41}.

Focada sob microscópio eletrônico, a junção dermo-epidérmica revela uma organização estrutural complexa que pode ser dividida em quatro áreas (FIG.2) que englobam: a membrana plasmática das células basais, lâmina lúcida, lâmina densa e sub-lâmina densa fibrilar^{39, 42}.

FIGURA 2 - Representação esquemática das características ultra-estruturais da lâmina basal da pele. IL= folheto interno; OL= folheto externo; TF=tonofilamentos; P=pirâmides hemidesmosomais; SBDP= placa densa sub-basal; Af= filamentos de ancoragem; LL= lâmina lúcida; LD = lâmina densa; MF = feixes de microfibrila; AF= fibrilas de ancoragem e C= colágeno³⁹.

- **Membrana plasmática das células basais:** Esta área compreende as faces externa (OL) e interna (IL) da membrana plasmática do queratinócito basal. Ao longo da face citoplasmática interna estende-se, de fora a fora, uma placa denominada placa hemidesmosomal que é constituída por zonas piramidais (P) muito densas cujas bases da pirâmide faceiam a derme e seus picos estão ligados com feixes de filamentos citoplasmáticos intermediários (TF)³⁹.
- **Lâmina Lúcida (LL):** A lâmina lúcida, que acomoda as células basais da epiderme²⁰ e separa a membrana plasmática dessas células da lâmina densa, apresenta-se relativamente amorfa sob microscopia eletrônica^{40, 42}, salvo por duas estruturas claramente definidas. A primeira denominada

placa densa sub-basal (SBDP), é uma linha elétron-densa granular que acompanha a placa hemidesmossoal, tendo exatamente o mesmo comprimento desta e está sempre disposta paralelamente à membrana plasmática basal. A outra estrutura, também na região dos hemidesmosmos, consiste de filamentos finos verticalmente orientados que correm paralelos uns aos outros a partir da face externa da membrana plasmática das células basais em direção à lâmina densa. Esses filamentos, que cruzam a lâmina lúcida perpendicularmente ao plano da derme, são chamados filamentos de ancoragem (Af) porque desempenham o papel de adesão das células basais à derme^{39,40}.

A lâmina lúcida é a localização primária de diversas glicoroteínas não colagenosas: laminina, antígeno penfigóide bolhoso e possivelmente fibronectina. Todas essas substâncias são importantes na promoção de adesão entre as células da epiderme e a lâmina densa¹.

- **Lâmina Densa (LD):** A lâmina densa tem uma aparência granular fina amorfa, e pode de alguma maneira variar quanto a espessura e densidade³⁹. O componente primário da lâmina densa é o colágeno tipo IV, um colágeno formador de redes que fornece suporte estrutural e flexibilidade¹. A lâmina densa funciona como uma barreira/filtro. Ela restringe a passagem de moléculas com peso molecular estimado em valor acima de 40,000¹.

Um sulfato de heparina proteoglicano associado à lâmina densa, provavelmente auxilia na regulação da permeabilidade restringindo a passagem de macromoléculas aniônicas.

- **Sub-lâmina densa fibrilar:** A sub-lâmina densa fibrilar está localizada imediatamente abaixo da lâmina densa. Ela representa a zona de adesão da lâmina densa à derme subjacente. Três tipos de estruturas fibrilares diferentes garantem a adesão: fibrilas de ancoragem³⁹ (AF), constituída principalmente por colágeno VII, sintetizado por queratinócitos e fibroblastos⁴⁰, feixes de microfibrilas (MF) dérmicas que provavelmente pertençam a uma rede de tecido elástico e fibras de colágeno (C)

randomicamente orientadas³⁹, embebidas em uma substância “solo” rica em glicosaminoglicanas⁴⁰.

3.1.3 Derme

A derme é o tecido conjuntivo constituído principalmente por colégeno e tecido conectivo elástico¹, sobre o qual a epiderme se apóia. Ela é caracterizada por uma superfície externa extremamente irregular, na qual observam-se saliências que acompanham reentrâncias presentes na epiderme. A essas saliências, denominadas papilas dérmicas, atribui-se a função de aumentar a zona de contato entre derme e epiderme, conferindo maior resistência à pele²¹.

Permeada por vasos sanguíneos e linfáticos, a derme responde ainda pela nutrição da epiderme avascular, além de representar o solo de implante para os anexos cutâneos³.

Os tipos celulares presentes na derme, podem ser classificados como nativos ou migratórios. As células nativas correspondem aos fibroblastos (com função de sintetizar moléculas que compõem a matriz extracelular), macrófagos e mastócitos, (com função imunológica). Já as células migratórias, representadas por linfócitos, plasmócitos e outras células derivadas de leucócitos, podem entrar na derme em resposta a estímulos variados¹.

Estruturalmente, a derme pode ser distinguida em dois estágios: a derme papilar e a derme reticular¹.

- **Derme papilar:** a derme papilar está localizada próxima a epiderme, molda o seu contorno e tem espessura próxima ou ligeiramente maior a ela¹⁹. Ela é constituída por um tecido conjuntivo frouxo cujas delgadas fibras de colágeno dos tipos I e III (fibras reticulares) e fibras elásticas estão dispostas em redes frouxas. As fibrilas de ancoragem, constituídas por colágeno do tipo VII, se estendem da membrana basal para dentro da camada papilar, ligando a epiderme à derme¹⁹. Fibras elásticas maduras não são encontradas normalmente na derme papilar, mas são comuns na pele de pacientes com certas doenças hereditárias do tecido conectivo, no envelhecimento da pele e na pele acidentalmente danificada¹.

Na derme papilar, a substância fundamental é abundante e as células são numerosas³: os linfócitos, mastócitos e macrófagos estão envolvidos na defesa inespecífica e na vigilância imunológica do tecido enquanto os fibroblastos, que estão presentes em maior número e tem capacidade proliferativa e sintética maior do que na derme reticular¹, respondem pela produção de elastina e colágeno⁴¹.

As terminações nervosas também são estruturas abundantes na derme papilar³ e a vascularização fica por conta de vênulas, arteríolas e alças capilares que nutrem as camadas profundas da epiderme e de vasos linfáticos^{3,22,41}.

- **Derme reticular ou córion:** representa 4/5 da espessura da derme³, estendendo-se da parte mais profunda da região papilar até a hipoderme¹, não existindo um limite nítido entre elas¹⁹. A interface entre a camada papilar e a camada reticular também não é distinta, já que as duas camadas são contínuas¹⁹.

A derme reticular é constituída por um tecido conjuntivo denso não modelado, apresentando espessas fibras de colágeno do tipo I compactadas em grandes feixes dispostos, em maior parte, paralelamente à superfície da pele¹⁹. Redes espessas de fibras elásticas encontram-se entremeadas com as fibras colágenas^{1,19}, sendo especialmente abundantes nas proximidades das glândulas sebáceas e sudoríparas¹⁹.

Em meio aos feixes de colágeno, encontram-se vasos sanguíneos que unem o plexo vascular da derme papilar, com os vasos maiores e mais profundos na junção entre a derme e subcútis²⁰.

Populações celulares: fibroblastos, macrófagos e mastócitos podem ser encontrados na derme reticular em menor densidade. Normalmente são observadas no interstício entre feixes e fibras de colágeno ou, em menor quantidade, ao redor de vasos sanguíneos (linfócitos)¹.

3.1.4 Hipoderme

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes²¹.

Dependendo da região observada e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma quantidade variável de tecido adiposo que quando desenvolvida, formará o panículo adiposo²¹.

A hipoderme não faz parte da pele, mas constitui a fáscia superficial situada imediatamente abaixo desta¹⁹ e desempenha, através do panículo adiposo, os papéis de isolante térmico e de reserva de nutrientes e energia para o organismo enquanto os adipócitos nela presentes, armazenam triglicérides como forma de reserva de lipídios, que fornecem ácidos graxos em caso de necessidade energética³.

3.2 *Meio de cultura e seus suplementos tradicionais*

A composição do meio de cultura é primordial, tanto para garantir a sobrevivência das células por longos períodos em cultura, quanto para assegurar uma boa reprodutibilidade experimental⁴³. Para isso, meios nutricionais quimicamente definidos baseados na análise de fluídos do organismo e na bioquímica nutricional foram formulados e podem ser acrescidos de aminoácidos, sais, vitaminas, glicose e outros fatores, dependendo do tipo celular a ser cultivado⁴⁴.

O método de cultivo preconizado por RHEINWALD, J.G. & GREEN, H. (1975) e até o momento utilizado como “padrão ouro” para a cultura de queratinócitos, emprega os meios *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e *F12 Nutrient Mixture* (F12), na proporção 2:1. Essa combinação resulta em uma alta concentração de aminoácidos, sendo os essenciais (Arg, Cys, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr e Val) fornecidos pelo DMEM e os não essenciais (Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, Pro e Ser), fornecidos pelo F12. Porém, para possibilitar a proliferação, migração e diferenciação celular, a composição do meio básico não é suficiente, ele deve ser suplementado com outros fatores⁴³ a saber:

3.2.1 Hidrocortisona

A adição de hidrocortisona às culturas secundárias e subseqüentes restaura a aparência estratificada epitelial regular das colônias, aumenta a expansão lateral das mesmas e estimula a proliferação celular⁷, além de prevenir a deterioração da camada de sustentação⁴⁵. Contudo, esses benefícios não são alcançados quando a hidrocortisona é adicionada ao meio de cultura em uma concentração superior a 10 µg/mL⁷.

3.2.2 Toxina colérica

Por ser capaz de aumentar os níveis de cAMP, a toxina colérica antagoniza a tendência dos queratinócitos a aumentarem de tamanho, mantendo assim maior proporção das pequenas células proliferativas em relação às aquelas comprometidas com o processo de diferenciação terminal, o que por sua vez, melhora a eficiência de formação de colônias⁴⁶.

Outra vantagem atribuída ao uso da toxina colérica deve-se ao fato dela não ser tóxica, mesmo em altas concentrações e de ativar a adenil ciclase de maneira irreversível⁴⁷, de modo que a multiplicação celular continue mesmo após ela ter sido retirada do meio de cultura⁴⁶.

3.2.3 Fator de crescimento epidermal (EGF)

Não é um mitógeno clássico para os queratinócitos humanos, porém quando adicionado ao meio de cultura, promove a migração das células a partir do centro das colônias com crescimento em direção às bordas da colônia¹⁰, que por sua vez, aumentando de tamanho, incrementa a fração dos queratinócitos em divisão e o seu tempo de vida em cultura, já que a diferenciação terminal é provavelmente induzida quando as células estão compactadas²⁴.

Juntos, a hidrocortisona, toxina colérica e EGF, partilham as propriedades de aumentar a fração clonogênica, a taxa de crescimento populacional e o tempo de vida em cultura (*life span*)⁴⁵, de maneira que uma grande quantidade de queratinócitos possa ser rapidamente obtida a partir de uma pequena biópsia de pele⁴⁷.

3.2.4 Insulina

O método de cultivo tradicional para queratinócitos, amplamente utilizado desde sua padronização, em 1975, inclui a insulina de pâncreas bovino entre seus componentes⁸.

O papel da insulina é controverso entre os pesquisadores. Muitos grupos não encontraram vantagens em utilizá-la enquanto outros obtiveram em seus trabalhos um estímulo ao crescimento, superior a 30%⁴⁸. O que parece evidente é que em pequenas quantidades, a insulina permite a entrada de glicose nos queratinócitos, sugerindo que seu efeito mitogênico se deva a esta propriedade^{48,44}. Em excesso, ela pode levar a uma queda da concentração de glicose do meio⁴⁸.

3.2.5 Triiodotironina (T3)

O hormônio T3 serve como suporte para vários tipos celulares⁴⁹ e assim como a insulina, é um suplemento amplamente utilizado nas formulações sem soro⁴³. O T3, a insulina e a transferrina reduzem o requerimento de soro de 20% para 10% e melhoram o rendimento celular em lotes de soro de baixa qualidade⁴⁵.

3.2.6 Adenina

A adenina favorece a seleção dos queratinócitos em cultura, graças ao efeito inibitório que exerce sobre os fibroblastos, por ventura presentes na semeadura inicial⁵⁰.

3.2.7 Glutamina

A glutamina é requerida pela maioria das células em cultura, sendo que evidências sugerem que seja utilizada por estas como fonte de energia e de carbono⁴⁴.

3.2.8 Antibióticos-antimicóticos

São empregados na prevenção da contaminação por bactérias e fungos. Alguns autores sugerem que, na medida do possível, o uso de antibióticos seja evitado. Primeiro porque microorganismos resistentes a antibióticos podem

se desenvolver, e depois, porque os antibióticos podem exercer efeitos adversos sobre o crescimento e função celular⁴³.

3.2.9 Soro Fetal Bovino

A utilização de fluidos biológicos, na tentativa de manter tecidos em cultura, nos remete a 1898, ocasião em que Ljunggren foi bem sucedido ao manter fragmentos de pele, por longos períodos, em líquido ascítico antes de transportá-los de volta ao doador original^{51,52}. Mais tarde, outros pesquisadores demonstraram ser possível o crescimento de células conectivas e epiteliais a partir de fragmentos de pele, desde que estes fossem apoiados por substratos e nutridos por meios apropriados que naquela época, consistiam de solução salina simples enriquecida com fluidos biológicos, como soro ou líquido ascítico⁵¹. Modificações subseqüentes dessas soluções primitivas consistiram da adição de aminoácidos ou peptídeos, o que abriu caminho para o desenvolvimento de meios padronizados existentes hoje em dia^{51,apud,53}. Contudo, apesar dos requerimentos, que levaram ao desenvolvimento de um meio complexo quimicamente definido, estarem parcialmente elucidados, uma concentração de soro de 5% a 20% normalmente ainda é necessária para um ótimo crescimento celular⁴⁹. Tal soro pode ter procedência variável, como: soro de bezerro, de cavalo ou humano⁴⁴. Porém, por ser um mistura de fatores necessários para a adesão, crescimento e proliferação celular e ainda por apresentar uma baixa concentração de γ -globulinas, o soro fetal bovino (SFB) é utilizado quase universalmente como um suplemento efetivo para a maioria dos tipos de células animais e humanas⁵⁴, fornecendo às culturas:

- nutrientes básicos em solução e ligados a proteínas⁴⁹
- fatores hormonais que estimulam o crescimento e proliferação celular e promovem funções diferenciadas^{49,54,55}
- fatores de adesão e espalhamento^{49,54,55}
- proteínas de ligação (albumina, transferrina) transportadoras de hormônios, vitaminas, minerais e lipídeos, etc^{49,54,55}
- fatores de estabilização e desintoxicantes necessários para manter o pH ou para inibir a ação de proteases^{49,55}

Apesar desses efeitos benéficos atribuídos ao emprego do soro, enquanto suplemento ao meio de cultura, sua utilização é limitada por apresentar inúmeras desvantagens a serem consideradas^{54,55}:

- variações quantitativas e qualitativas entre diferentes lotes^{44,49,54,55,56}
- crises periódicas no fornecimento^{44,49,54}
- custo elevado^{44,55}
- potencial fonte de contaminantes, como fungos, bactérias, vírus e príons^{12,49,54,55,56}
- possibilidade de reações imunes às proteínas xenobióticas¹²
- possível presença de diferentes quantidades de endotoxinas, hemoglobina e outros fatores adversos^{54,56}
- questões éticas envolvendo o uso de animais, já que a coleta do SFB é feita por punção cardíaca^{13,56}.

Por esses inconvenientes, as últimas décadas tem sido marcadas por esforços contínuos na busca por alternativas que superem os problemas associados ao emprego de soro fetal bovino como suplemento do meio de cultura¹⁴.

3.3 Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos anucleados discóides (2 a 4 µm), formados na medula óssea, a partir do amadurecimento e fragmentação citoplasmática de sua célula precursora, o megacariócito^{57,58}. Em condições normais, o valor de referência para a concentração de plaquetas no sangue periférico, é da ordem de 130.000 a 400.000/mm³⁵⁸. Elas tem um período médio de vida entre 7 e 10 dias, antes de serem removidas da circulação pelo sistema fagocitário (mononuclear), principalmente do baço⁵⁹.

As plaquetas possuem uma cobertura externa rica em material mucopolissacarídeo e glicoproteínas (GPs) específicas GP Ib e GPIIb/IIIa que atuam, respectivamente, na adesão e agregação plaquetária, e os fatores V e VII^{57,60}. Mais internamente, apresentam ultra estruturas (FIG. 3), onde pode-se observar uma membrana trilaminar que invagina para dentro do citoplasma,

formando um sistema canicular aberto (SCA ou SC)⁶¹ que fornece uma grande superfície, na qual os fatores de coagulação podem ser adsorvidos. Além disso, o SC é uma via de comunicação com o meio externo, a qual permite que as substâncias secretadas sejam transportadas para o exterior, ao mesmo tempo que estímulos para a ativação celular sejam transmitidos no sentido inverso⁶². Logo abaixo da membrana trilaminar, na região sub-membrana, nota-se a presença de microtubulos (MT) que contornam a circunferência plaquetária garantindo a manutenção da forma da célula, enquanto filamentos submembranosos (FSM), associados a eles, estão envolvidos na contração e secreção das plaquetas e na retração do coágulo^{61,62}. As plaquetas também possuem grãos de glicogênio (GLI), que constituem material de reserva ou fonte de energia para a célula; organelas como mitocôndrias (Mi), que são responsáveis pela síntese de ATP^{61,62}; sistema tubular denso (STD), que contém quantidades substanciais de cálcio e pode ser local de síntese prostaglandina e tromboxane A₂; peroxissomos, que contem catalase; lisossomos, hidrolases ácidas; grânulos (G) como os corpos densos (ou grânulos σ) (CD), que contem cálcio, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) e seratonina⁶¹; e os grânulos α , que são os mais abundantes nas plaquetas. Estes apresentam mais de 30 proteínas bioativas, muitas das quais tem papel fundamental na hemostasia e ou cicatrização do tecido⁶³. Essas proteínas podem ser fatores de crescimento, como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator 4 plaquetário (PF-4), fator de transformação do crescimento β (TGF- β); fatores de coagulação (fator V, fibrinogênio, fator VIII) e proteínas de adesão (fibronectina, trombospondina, vWF= fator von Willebrand, vitronectina)⁶².

FIGURA 3 - Corte esquemático da ultra-estrutura da plaqueta. (MC) = membrana celular, (SC) = sistema canicular, (Mi) = mitocôndrias, (FSM) = filamento submembranoso, (GLI) = grãos de glicogênio, (MT) = microtúbulos, (CD) = corpos densos, (G) = grânulos, (STD) = sistema tubular denso⁵⁹.

Os fatores de crescimento parecem agir de três maneiras distintas: parácrina (onde os fatores de crescimento secretados por uma célula estimulam células vizinhas), autócrina (onde os fatores liberados pela célula atuam sobre ela própria) e endócrina (onde os fatores liberados pela célula podem exercer influência sobre outra célula com fenótipo e localização anatômica diferente). Os fatores de crescimento são capazes de induzir efeitos sobre diversos tipos celulares e podem, portanto, ativar uma série de funções celulares em diferentes tecidos, como pode-se observar na Tabela 1⁶⁴.

TABELA 1. Resumo dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas⁶⁴

CRESCIMENTO	FONTE	FUNÇÃO
Fator Transformador do Crescimento β , TGF- β	plaquetas, matriz celular óssea, matriz da cartilagem, células TH1 e células <i>natural killer</i> , macrófagos/monócitos e neutrófilos	Estimular a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, regular a mitogênese endotelial, fibroblástica e osteoblástica, regular efeitos mitogênicos de outros fatores de crescimento, estimular a quimiotaxia e angiogênese, inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos
Fator Básico de Crescimento para Fibroblastos, bFGF	plaquetas, macrófagos, células mesenquimais, condrócitos, osteoblastos	Promover o crescimento e diferenciação dos condrócitos e osteoblastos, mitogênico para células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos
Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, PDGFA-b	plaquetas, osteoblastos, células endoteliais, macrófagos, monócitos, células musculares lisas	Mitogênico para células mesenquimais e osteoblastos, estimular a quimiotaxia e mitogênese em fibroblastos, células musculares lisas, células glia, regular a secreção e síntese de collagenase, estimular a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos
Fator de Crescimento Epidermal, EGF	plaquetas, macrófagos, monócitos	Estimular a quimiotaxia/angiogênese endotelial, regular a secreção de collagenase, estimular a mitogênese epitelial/mesenquimal
Fator de Crescimento Endotelial Vascular, VEGF	plaquetas, células endoteliais	Aumentar a angiogênese e permeabilidade vascular, estimular a mitogênese para células endoteliais
Fator de Crescimento do Tecido Conectivo, CTGF	plaquetas através de endocitose do meio extracelular na medula óssea	Promover a angiogênese, regeneração da cartilagem, fibrose e adesão de plaquetas

3.3.1 Hemostasia

Hemostasia é o processo pelo qual o organismo procura controlar a perda sanguínea através de um vaso lesado, evitando hemorragias^{59,62}. Concomitantemente, pode-se incluir a este conceito a propriedade que o sangue tem de se manter fluido no interior dos vasos, evitando a formação de trombos em vasos que não foram danificados^{59,65,66} ou a oclusão de um vaso, por trombos, após uma lesão relativamente leve (trombose)⁶⁶.

Tanto a hemostasia quanto a trombose, envolvem três componentes: a parede vascular, as plaquetas e a cascata de coagulação⁶⁶.

As células endoteliais modulam diversos aspectos da hemostasia normal. O equilíbrio entre as atividades endoteliais anti e pró-trombóticas

determinam se ocorre a formação, propagação ou dissolução do trombo. No estado basal, as células endoteliais exibem propriedades antiplaquetária, anticoagulante e fibrinolítica⁶⁶.

A lesão vascular resulta na ruptura da camada endotelial que por sua vez, expõe o tecido conjuntivo subendotelial para onde as plaquetas são atraídas, aderem às fibras colágenas locais e são ativadas (FIG.4). A adesão é intermediada pelo fator de Von Willebrand (FvW), que atua como uma ponte entre os receptores da superfície plaquetária (ex., Gplb), e o colágeno exposto⁶⁶. Uma vez ativadas, as plaquetas secretam os produtos de seus grânulos, que incluem o cálcio (ativa proteínas de coagulação) e ADP (mediador da agregação de mais plaquetas e sua degranulação). As plaquetas ativadas também sintetizam tromboxano A₂ (TXA₂), que além de vasoconstritor, é um potente estimulador a agregação plaquetária^{59,66}. O ADP liberado estimula a produção de um tampão hemostático primário por meio da ativação dos receptores GpIIb-IIIa, que por sua vez, facilitam a ligação e a reação cruzada do fibrinogênio⁶⁶.

FIGURA 4 - Fotomicroscopia de (A) plaqueta em repouso, (B) plaqueta ativada PRP⁶⁷.

O tampão hemostático primário formado é suficiente para sanar o sangramento apenas em caráter temporário⁵⁹. A formação do tampão secundário definitivo requer a ativação da trombina para clivar o fibrinogênio e formar a fibrina polimerizada através da cascata de coagulação⁶⁶.

3.3.1.1 Vias da cascata de coagulação

A cascata da coagulação é, essencialmente, uma série amplificadora de conversões enzimáticas; cada etapa no processo cliva proteoliticamente uma pró-enzima inativa para formar uma enzima ativa⁶⁶. Tradicionalmente, a cascata

de coagulação é dividida em duas vias relativamente independentes, a via intrínseca e a extrínseca (FIG. 5) que se encontram em uma determinada fase e seguem uma via comum que culmina com a formação de fibrina^{59,68}.

FIGURA 5 - Esquema da cascata de coagulação proposto na década de 1960, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias⁶⁹.

- **Via intrínseca:** consiste de uma cascata de reação de proteases iniciada por fatores que estão presentes no sangue.

Após a lesão vascular e exposição do colágeno, o fator XII é ativado (XIIa) ao ligar-se com superfícies de carga negativa tais como complexos antígeno-anticorpo, endotoxinas e a superfície de uma plaqueta ativada⁷⁰. Uma molécula conhecida como cininogênio de alto peso molecular (CAPM), auxilia nesta ligação e, portanto, é considerada um co-fator⁷¹, muito embora a conversão do fator XII em fator XIIa auxiliada pelo CAPM seja limitada na velocidade. Uma vez que uma pequena quantidade de fator XIIa se acumula, esta protease converte pré-caliceína em caliceína, tendo CAPM como suporte. A caliceína recém formada, por sua vez, acelera a conversão do fator XII em XIIa, um exemplo de retorno positivo. Além de sua própria geração, pela formação de caliceína, o fator XIIa (junto com CAPM) cliva proteoliticamente o fator IX, formando o fator IXa. (que também liga-se a superfícies carregadas, através da CAPM), que

também é uma protease⁷¹. O fator IXa forma, com o fator VIII, íons cálcio e fosfolípide da plaqueta, um complexo que ativa o fator X (Xa). Na sequência, o fator Xa, se liga ao fator V, cálcio e fosfolípide da plaqueta, formando um segundo complexo, que ativa o fator II (IIa), que converte o fibrinogênio em fibrina, sendo esta o produto final da coagulação. A fibrina formada é instável e pela ação do fator XIII (fator estabilizador da fibrina), se transforma em fibrina estável e insolúvel, que mantém um coágulo resistente⁵⁹.

- **Via extrínseca da coagulação:** É um meio alternativo para ativar o fator X sem a participação dos fatores XII, XI, IX e VIII⁵⁹. Tem início com a liberação da “tromboplastina tecidual” (Fator III) na circulação após lesão endotelial do vaso. A tromboplastina combina-se com o fator VII, ativando-o na presença de Ca^{++} . O complexo formado ativa o fator X (Xa) desencadeando a via comum até a formação da fibrina estável⁷⁰.

Na TAB. 2, pode-se observar a nomenclatura e origem dos diversos fatores envolvidos na cascata de coagulação

TABELA 2. Fatores da coagulação: Nomenclatura e local de formação⁵⁹

FATOR	Nomenclatura mais usada	Origem
I	Fibrinogênio	Fígado e SRE
II	Protrombina	Fígado
III	Tromboplastina	Tecidos em geral
IV	Cálcio	Tecidos em geral
V	Fator Lábil	Fígado, megacariócitos
VII	Fator Estável	Fígado
VIII C	Fator anti-hemolítico A	SRE e endotélio, fígado
VIII vW	Fator von Willebrand	Endotélio, SRE, megacariócitos
IX	Fator anti-hemolítico B	Fígado
X	Fator Stuart-Prower	Fígado
XI	Fator anti-hemolítico C	Fígado
XII	Fator de contato	Fígado, megacariócitos
XIII	Fator estabilizador da fibrina	Fígado
Precalicroína	Fator Fletcher	Fígado
Cininogênio de elevado peso molecular	Fator Fitzgerald-Williams	Fígado
Proteína C		Fígado
Proteína S		Fígado

3.3.1.2 Fibrinólise

A última etapa da hemostasia compreende o mecanismo de fibrinólise, ou seja, a dissolução da fibrina formada⁶². Essa dissolução se dá por meio da ação da plasmina, uma enzima que circula em forma de um zimogênio inativo e pode ser ativada por uma protease serina produzida pelas células endoteliais, denominada ativador do plasminogênio tecidual (tPA)⁶⁸.

A plasmina quebra a fibrina e também o fibrinogênio em pequenos fragmentos chamados produtos de degradação da fibrina (PDF)^{59,70}. Esses fragmentos são pequenos peptídeos que devem ser removidos da circulação pelo sistema reticuloendotelial, caso contrário, em alta concentração no sangue, eles podem agir como potentes inibidores da formação de coágulos e também alterar a função plaquetária⁵⁹.

3.3.2 Mecanismos de ação da heparina

A heparina foi descoberta acidentalmente por um estudante de medicina no ano de 1916 e recebeu este nome por ter sido extraída, inicialmente, do fígado. Ela não corresponde a uma única substância e sim a uma família de mucopolissacarídeos sulfatados encontrados com a histamina, nos grânulos dos mastócitos. As preparações comerciais são extraídas do pulmão bovino ou do intestino dos suínos⁷².

As heparinas nas preparações não fracionadas (UFH), de baixo peso molecular (LMWH) e pentassacarídeo sintético (*fonda-parinux*) são tidas como inibidoras indiretas da trombina, pelo fato de exercerem seu efeito antitrombótico através da interação com a antitrombina (III)⁷³, um importante inibidor da cascata de coagulação⁷².

A antitrombina inibe a trombina (IIa) e outras serinas-proteases através de sua ligação ao sítio ativo da serina.

A heparina, por sua vez, modifica essa interação antitrombina-serina ao ligar-se, através de uma sequência de pentassacarídeos peculiares, à antitrombina III, modificando sua configuração e aumentando sua velocidade de ação⁷².

A trombina é consideravelmente mais sensível ao efeito inibidor do complexo heparina-antitrombina III do que o fator X. Para inibir a trombina, é

necessário que a heparina se ligue tanto à enzima quanto à antitrombina III; para inibir o fator X, é necessária a ligação apenas com a antitrombina III. Assim, a LMWH aumenta a ação da anti-trombina III somente sobre o fator Xa, mas não sobre a trombina, visto que as moléculas são demasiadamente pequenas para ligar-se simultaneamente à enzima e ao inibidor⁷².

3.3.3 Lisado de plaquetas

A possibilidade da existência de fatores mitogênicos nas plaquetas foi sugerida pela primeira vez por Balk, que ao comparar o desenvolvimento de fibroblastos de frango, cultivados em meios de cultura suplementados com soro ou plasma de frango, inativados pelo calor, observou uma maior proliferação no primeiro caso, levando-o a crer que algum fator de crescimento até então desconhecido, fosse liberado a partir de precursores no plasma ou a partir de plaquetas, durante a reação de coagulação⁷⁴.

Hoje sabe-se que as plaquetas consistem em uma fonte rica, não apenas em fatores de crescimento, mas também em citocinas e diversos outros fatores envolvidos na reparação tissular, como: fibronectina^{13,14,75}, fibrinogênio⁷⁵, fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)⁷⁵ fator de crescimento epidermal (EGF)^{75,76}, serotonina^{14,75}, fator básico de crescimento para fibroblasto (bFGF)^{75,76}, fator plaquetário- 4 (PF-4)¹⁴, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator β transformador do crescimento (TGF β)^{13,14,75,76}, que encontram-se alojados nos grânulos α plaquetários⁷⁵ e podem ser liberados através da ativação dessas células, por meio da adição de trombina, ou através de sua lise por sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento⁷⁷.

Com base nessas propriedades, produtos derivados de plaquetas como o plasma rico em plaquetas (PRP)^{78,79} e lisado de plaquetas (LP)^{75,76,77,78,79} tem sido postulados como substitutos ao Soro Fetal Bovino, buscando superar parte dos problemas associados ao uso deste⁷⁸.

Assim como o SFB, contratempos relacionados à utilização de derivados de plaquetas também tem sido mencionados na literatura, como a variação do conteúdo fatores de crescimento que pode ocorrer devido a diferentes concentrações de plaquetas, modo de preparo, contaminação por células

sanguíneas brancas e mecanismos para liberação dos fatores de crescimento⁷⁶. Por outro lado, diversos estudos tem apontado o lisado de plaquetas como potencial substituto ao SFB, principalmente no cultivo de células mesenquimais^{76,78,80,81} mostrando-se inclusive superior a esse, diminuindo o tempo necessário para as células atingirem confluência e aumentando o tamanho das unidades formadoras de colônias, sem que isso comprometesse as propriedades de diferenciação e a atividade imunossupressora dessas células⁸⁰.

O lisado de plaquetas, portanto, além de ser fonte de fatores de crescimento necessários para a expansão celular em cultura⁸⁰, evita a contaminação por *príon* bovinos, viroses animais e zoonoses⁷⁶ e, ao mesmo tempo, não se opõe a questões éticas que envolvam o uso de animais¹³. Desta forma, ele pode ser considerado um potencial substituto ao SFB no desenvolvimento de produtos de engenharia de tecidos e células destinadas ao cenário clínico⁸⁰.

3.4 Camada de Sustentação (Feeder layer)

As suspensões celulares obtidas por tripsinização contêm predominantemente queratinócitos, embora células de Langerhans, células de Merkel, melanócitos e fibroblastos também estejam presentes. As células de Langerhans e de Merkel não sobrevivem à cultura e os melanócitos não proliferam, ao menos que condições especiais de cultivo sejam adotadas⁴⁵. Já os fibroblastos representam a maior fonte de contaminação das células epidermais⁴⁵ e tendem a exibir uma taxa de crescimento que se sobrepõe àquela alcançada pelas células de interesse^{7,47}. Por outro lado, fibroblastos secretam várias citocinas solúveis (interleucinas 6 e 8, IL-6, IL-8)⁸², fatores de crescimento (KGF, TGF β , FGF)⁸³ e componentes da matriz extracelular (fibronectina, colágeno IV e laminina) que promovem a adesão e proliferação das células epiteliais⁸⁴. Além disso, o contato direto dos fibroblastos e das células epiteliais desempenha um papel importante na prevenção da diferenciação das últimas⁸². Deste modo, a presença de fibroblastos na cultura de queratinócitos torna-se algo desejável, desde que sua proliferação possa ser controlada⁷. Essa condição foi alcançada por Rheinwald e Green, que em 1975 inovaram o método de cultivo para

queratinócitos propondo a utilização de uma camada de sustentação (*feeder layer*) composta por fibroblastos murinos com a taxa de proliferação controlada por meio de radiação ionizante ou de drogas anti cancerígenas, como a Mitomicina C^{6,7}.

Como o próprio nome, em inglês, sugere o *feeder-layer* produz fatores nutricionais requeridos pelos queratinócitos⁸ além de orientar a formação de suas colônias⁸⁵ e inibir a proliferação dos fibroblastos humanos obtidos durante a digestão enzimática para a obtenção de queratinócitos^{8,47,86,87}. A ação entre queratinócitos e fibroblastos, observada nesse sistema de co-cultura, é recíproca e baseia-se em 3 processos básicos: produção de fatores solúveis que exibem atividades autócrinas e parácrinas, interações com a matriz extra celular e sinalização pelo contato direto célula a célula. Em outras palavras, os queratinócitos não se beneficiam passivamente dos fatores constitutivamente expressos nas células mesenquimais, mas induzem ativamente a expressão de fatores de crescimento nos fibroblastos⁸⁸. Um bom exemplo disso é a interleucina 1 (IL-1), que apesar de não ter efeito direto sobre os queratinócitos, induz, nos fibroblastos, a expressão de fatores como o fator de crescimento para queratinócitos (KGF)⁸⁸ e da interleucina-6 (IL-6)⁸⁹; o KGF atua especificamente sobre as células epiteliais, promovendo a proliferação dos queratinócitos e inibindo a diferenciação e apoptose dos mesmos⁸⁴ enquanto a interleucina 6 (IL-6) é mitogênica para as células epiteliais⁸². Além disso, queratinócitos produzem outras citocinas como a interleucina 8 (IL-8)⁸⁹ e fatores de crescimento como fator transformador do crescimento (TGF α) e fator básico de crescimento para fibroblastos (bFGF), que podem ter um papel na regulação autócrina de sua migração e proliferação⁹⁰.

Assim a semeadura de células epidermais sobre a camada de sustentação composta por células 3T3 irradiadas permite que os queratinócitos se multipliquem e formem colônias macroscópicas a partir de células isoladas e ao mesmo tempo, suprime a proliferação de fibroblastos dérmicos⁷.

Já para minimizar a proporção de células comprometidas com a diferenciação terminal, Rheinwald e Green (1989) propuseram ainda que antes

das células ficarem compactas no interior das colônias e impedidas de realizar uma migração centrífuga, estas deveriam ser submetidas à ação enzimática e as células assim dissociadas, semeadas sobre novas garrafas contendo uma camada de sustentação. As ampliações então obtidas, além de atender o objetivo de diminuir a fração de células comprometidas com a diferenciação terminal⁸, possibilitam que a partir de um pequeno fragmento de tecido inicial, uma grande quantidade de epitélio cultivado seja obtido⁴⁷.

A semeadura dos queratinócitos sobre uma camada de sustentação consiste no que denominamos “semeadura em baixa densidade”, uma vez que nesta condição podem ser semeados um número de queratinócitos dez vezes menor do que aqueles necessários para semear estas células na ausência dessa camada (semeadura em alta densidade)⁶.

3.5 Testes de viabilidade celular

3.5.1 Eficiência de formação de colônias

A exemplo do que ocorre em seu meio natural, as células da epiderme humana formadoras de colônias são heterogêneas quanto a sua capacidade de suportar o crescimento⁹¹. Tendo em vista que condições ideais de cultivo permitem o desenvolvimento de uma colônia a partir de uma única célula semeada^{6,7,92}, o potencial de crescimento desta célula pode ser estimado com base nas características da colônia a que ela dará origem⁹²; o que pode ser facilmente evidenciado pela fixação e coloração de suas células, (formaldeído 3,7%, Rhodamina B 1%) após 12-14 dias de cultivo⁹³.

Cada queratinócito formador de colônia pode dar origem a um entre três tipos de colônias, que diferem entre si pela sua morfologia e pelas características das células nelas incluídas⁹². A saber:

- **Holoclon** (Holo = inteiro)⁹²: é o queratinócito com maior capacidade de multiplicação (célula fonte, ou célula tronco)³⁰. Ele dá origem a colônias grandes (10-30mm²) e de crescimento rápido, com perímetro suave a aproximadamente circular. Essas colônias contêm, predominantemente, células pequenas que podem estar concentradas próximas ao perímetro.

Quando colônias geradas a partir de um holoclone são subcultivadas, menos de 5% de suas células darão origem à colônias terminais⁹².

- **Meroclone** (Mero = parcial): é o queratinócito cuja propensão a gerar uma colônia terminal é maior do que a dos queratinócitos classificados como holoclones e menor que aqueles classificados como paraclones. A colônia gerada a partir de um meroclone apresenta um perímetro irregular, o que sugere uma heterogenicidade em seu interior e crescem progressivamente a um tamanho macroscópico, mas não chegam a alcançar o tamanho típico das colônias geradas por um holoclone. Quando uma colônia oriunda de um meroclone é sub-cultivada, suas células isoladas dão origem tanto a colônias em desenvolvimento como a colônias terminais, podendo estas últimas corresponder a mais de 5% e menos de 100% do total de colônias obtidas após o subcultivo⁹².
- **Paraclone:** (Para = mais longe): é o queratinócito cujo tempo de vida não ultrapassa 15 gerações. Ele dá origem uma colônia pequena ($>5\text{mm}^2$) e altamente irregular na qual as células são grandes e achatadas e a proliferação é praticamente inexistente. Quando subcultivadas, as células geradas por um paraclone não formam colônias ou formam apenas colônias terminais⁹².

A distribuição dos tipos clonais em uma população de queratinócitos, portanto, fornece informações sobre potencial de crescimento desta⁹², e a eficiência de formação de colônias, dada pela porcentagem de colônias obtidas em relação às células semeadas, permite checar a qualidade do sistema de cultivo e identificar condições inadequadas, desde que controles bem definidos sejam utilizados⁹³. Além do mais, os valores percentuais obtidos a partir da EFC de cada sub-cultivo, consistem de dados importantes para o teste de avaliação do tempo de vida celular em cultura (*life-span*), feito paralelamente³³.

3.5.2 Avaliação do tempo de vida celular em cultura (*Life span*)

Conhecido como o termo em inglês *life-span*, esse teste permite estimar o tempo de vida útil de uma cultura celular quando esta é mantida sob

condições específicas⁹⁴. Para tanto, células em culturas sub-confluentes são tripsinizadas, contadas e ressemeadas, na mesma densidade, em outra garrafa de cultura. Procedimento que se repete por sucessivas vezes, até que as células se tornem senescentes e completamente convertidas a células formadoras de paraclones^{33,94}.

O número de duplicações celulares alcançado até então pode ser estimado com base no cálculo³³:

$$X = 3,322 * \log(N/N_0)$$

Onde, X é o número de gerações

N é o número de células obtidas após cada tripsinização

N₀ é o número de células semeadas multiplicadas pela EFC correspondente.

Acredita-se que o resultado de uma EFC inferior a 0,1%, signifique a impossibilidade de crescimento celular na passagem seguinte²⁴ e, portanto, o ponto final do teste de *life-span*.

Esta avaliação pode ser utilizada não só para estimar o tempo de vida útil das células em cultura, mas também para constatar a qualidade do desenvolvimento destas células ao longo do tempo.

3.5.3 Ensaio MTS

O ensaio utilizando MTS permite observar possíveis diferenças quanto ao potencial de viabilidade e proliferação celular, quando estas células são submetidas a diferentes condições de cultura, sendo um método colorimétrico que envolve o uso de soluções de um composto tetrazólio (3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-sal tetrazólio MTS e um reagente de acoplamento de elétrons (fenazina metasulfato, PMS)⁹⁵. Por meio da ação de enzimas mitocondriais das células vivas, os componentes do tetrazólio são reduzidos em produtos de formazan intensamente corados^{96,97} cuja intensidade de coloração, que pode ser lida em espectrofotômetro (490 nm)^{95,98} é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, à quantidade de células viáveis em cultura^{96,97}.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Obtenção dos materiais biológicos*

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (OF.COEP/448/10) (ANEXO A) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq/HC-FMUSP) sob cadastro de número 0515/10 (ANEXO B).

O lisado de plaquetas utilizado neste estudo, foi obtido a partir de bolsas de concentrado de plaquetas, com prazo de validade expirado, doadas pela Fundação Zerbini – Instituto do Coração – HCFMUSP, já submetidas a testes sorológicos como: testes específicos para SIDA, hepatite B, hepatite C, sífilis, doença de Chagas, HTL (vírus linfotrófico de células T humanas) I e II, sorologia para citomegalovírus e toxoplasmose e que estivessem com validade, para fins de transfusão,. Tais bolsas foram mantidas congeladas (-70 °C) até o momento de uso.

Queratinócitos e fibroblastos humanos foram obtidos a partir de amostras de 5 doadoras de pele normal, submetidas à mamoplastia com finalidade estética, doadas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas (IHC) da FMUSP, para esta pesquisa.

Os fibroblastos murinos (código CCL-92, da ATCC) empregados na obtenção de queratinócitos humanos utilizados neste estudo, foram irradiados à 60 Gy em irradiador de Cobalto-60 tipo Gammacell, sendo utilizados imediatamente ou congelados até o momento da sua utilização.

4.2 *Descarte de material biológico*

Quanto ao descarte de bolsas vazias e resíduos de material biológico, estes foram submetidos a ação de hipoclorito de sódio por 30 minutos antes de serem descartados em saco plástico branco e leitoso apropriado para o descarte de material infectante.

4.3 *Preparo dos lisados de plaquetas*

4.3.1 Lisado para o teste de heparina

Selecionamos 3 bolsas de concentrado de plaquetas do tipo sanguíneo A positivo, com média de $8,5 \times 10^8$ plaquetas/mL.

Após descongelamento, o volume de cada bolsa, por nós denominadas 1, 2 e 3, foi igualmente distribuído em 3 embalagens duplas de poly-nylon, pré-identificadas como A, B e C; de modo que ao final desse processo obtivéssemos 9 amostras: 1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B, 1C, 2C e 3C.

Aos grupos A e B, adicionamos 100 UI/mL de heparina (Hemofol®) e em seguida, submetemos o total das amostras (heparinizadas e não heparinizadas) a 4 processos consecutivos de congelamento (-80 °C por 6 horas) e descongelamento (37 °C por 15 minutos).

O volume de plasma contido em cada embalagem foi então medido, transferido para tubos de centrifugação (50 mL) e centrifugado a 3615 *g* durante 30 minutos⁸¹. Esse processo de centrifugação foi repetido 4 vezes para a remoção de restos de plaquetas e, nos intervalos entre as centrifugações, as amostras foram fotografadas e observadas quanto ao volume do sobrenadante, formação de coágulos, precipitados, sedimentação e agregados de superfície.

Por fim, unimos as amostras do mesmo subgrupo (1A+ 2A+ 3A, obtendo o lisado A - **LPA**), (1B+2B+3B, obtendo o lisado B- **LPB**) e (1C+2C+3C, obtendo o lisado C- **LPC**) e realizamos uma pré-filtragem, através de membrana de nylon com póros de 100 µm, para remoção dos resíduos em suspensão. Ao final do processo, a esterilização foi feita por filtragem sob pressão negativa, em filtros com membranas de PVDF com póros de 0,45 µm.

Os lisados de plaquetas foram aliquotados e estocados a -20 °C até o momento da confecção dos meios a serem testados.

4.3.2 Lisado para o teste do tipo sanguíneo

Descongelamos 6 bolsas pré selecionadas de cada tipo sanguíneo, todas fator RH+, com média de $8,5 \times 10^8$ plaquetas/mL. A cada uma, acrescentamos 100 UI/mL de heparina (Hemofol®) e em seguida, a exemplo do teste anterior (4.3.1), submetemos as bolsas a repetidos processos de congelamento e descongelamento.

Após o último descongelamento, reunimos 67 mL de cada bolsa em um único lote denominado *pool* dos tipos sanguíneos. Tanto o *pool*, como cada tipo sanguíneo, foram transferidos para tubos de centrifugação de 500 mL e submetidos a 4 processos de centrifugação à 3615 *g* durante 30 minutos. A partir

daí, os processos de pré-filtragem, esterilização e estocagem foram efetuados de acordo com o teste anterior (4.3.1).

4.4 *Preparo dos meios de cultura para obtenção, propagação e utilização dos queratinócitos humanos*

O meio de cultura utilizado para semeadura dos queratinócitos e por nós denominado K- (K menos), foi preparado da seguinte maneira: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e F12 Nutrient Mixture (2:1), L-glutamina (4 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL), adenina (0,18 mM), hidrocortisona (0,4 µg/mL), toxina colérica (0,1nM), triiodo-L-tironina (20 pM), insulina de pâncreas bovino (5 µg/mL) e soro fetal bovino (10%). O meio de cultura utilizado nas trocas subsequentes, para manutenção das células, é adicionado de fator de crescimento epitelial (EGF), na concentração de 10 ng/mL e denominado K+ (K mais).

4.5 *Obtenção de queratinócitos humanos*

A cultura primária de queratinócitos foi baseada na metodologia proposta por Rheinwald e Green em 1975⁷, resumidamente descrita a seguir (FIG. 6):

Depois de lavados e descontaminados, em solução fisiológica e etanol 70%, respectivamente, os fragmentos de tecido foram dissecados com auxílio de pinça e tesoura curva, de modo que a maior quantidade possível de derme fosse retirada.

O tecido dissecado foi então cortado em fragmentos de aproximadamente um mm², que após a imersão em tripsina 0,05%/ EDTA 0,02%, foram transferidos para um frasco contendo barra magnética estéril (*frasco spinner*) e incubados a 37°C sob agitação branda, durante 30 minutos.

Findado este tempo, a solução de tripsina contendo células em suspensão, foi transferida para um tubo de fundo cônico e a ação da enzima foi neutralizada pela adição de solução contendo íon cálcio e albumina (v/v). A mistura obtida foi centrifugada a 378 g durante 5 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o botão de células formado foi ressuspensionado em meio de cultura K-. Então, as células em suspensão foram contadas em câmara hemocitométrica e reservadas.

O procedimento descrito anteriormente foi repetido até que o número de células extraídas começasse a decair. Neste momento, as células reservadas foram reunidas e semeadas em frascos com superfície de cultivo de 25 cm², na proporção de 20.000 células/cm² sobre camada de sustentação (*feeder-layer*) formada por 25.000 células/cm² CCL-92 previamente irradiadas a 60 Gy em irradiador de Cobalto-60 tipo Gammacell.

Os conjuntos queratinócitos/camada de sustentação foram mantidos em incubadora à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e tiveram seu meio de cultura substituído por K+ e trocado a cada 48 horas. As células foram mantidas em cultivo até atingirem sub-confluênciaⁱⁱ, quando foram destacadas da superfície de cultivo, pela ação enzimática (tripsina 0,05%/ EDTA 0,02%), e semeadas em frascos contendo nova camada de sustentação. A essa tática dá-se o nome de amplificação da cultura, sendo esta repetida até atingir um número suficiente de células para realização dos experimentos, o que geralmente aconteceu na segunda passagem.

FIGURA 6 - Sequencia da cultura primária de queratinócitos, desde a lavagem e descontaminação do tecido, até a obtenção das células isoladas para serem semeadas sobre a camada de sustentação.

ⁱⁱ NA: 70%-80% de confluência celular

4.6 Preparo e testes dos diferentes meios de cultura

Com exceção da toxina colérica e dos componentes xenobióticos utilizados (insulina e soro fetal bovino), todos os componentes foram mantidos nas mesmas concentrações utilizadas para a confecção do meio K+.

O meio K+ foi utilizado como controle dos experimentos e as variáveis foram testadas de acordo com o que segue:

4.6.1 Teste de adição de heparina

Foram utilizadas 5 placas de 96 poços, sendo a primeira destinada ao teste de adesão e as quatro restantes, destinadas à comparação da viabilidade dos queratinócitos em relação ao seu controle acompanhada ao longo de 24, 48, 72 e 96 horas.

Ambos os testes foram efetuados, semeando-se 20.000 queratinócitos/poço (alta densidade), utilizando 5 poços por variável e células cultivadas em meio K+ como controle do experimento. O meio K+, sem células, foi empregado para determinar o valor basal a ser descontado dos valores obtidos na leitura de absorbância.

Para o teste de adesão, as células foram semeadas em meios variados (M1 a M9 e CØ) conforme apresentado na TAB.3. Após 24 h de incubação à 37 °C e atmosfera de CO₂ à 5%, esses meios foram removidos e os poços, lavados com PBS, foram preenchidos com 120 µL de solução MTS/PMS (*Cell Titer 96® - Ensaio Aquoso não radioativo de proliferação celular* - PROMEGA CORPORATION) diluída em meio K+.

TABELA 3: Meios com variação no momento da adição de heparina

COMPONENTES	MEIOS									
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CØ
Lisado A	10%	5%	2,5%	****	****	****	****	****	****	****
Lisado B	****	****	****	10%	5%	2,5%	****	****	****	****
Lisado C	****	****	****	****	****	****	10%	5%	2,5%	****
Toxina Colérica	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM
Insulina Bovina	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
Heparina	2UI/mL	2UI/mL	2UI/mL	****	****	****	****	2UI/mL	2UI/mL	****
SFB	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

Seguiu-se então novo período de incubação e posterior medida de absorbância a 490 nm, em espectrofotômetro de placa de ELISA, até que a leitura máxima obtida atingisse um valor entre 1,2 e 1,8.

Para o teste de comparação da viabilidade celular, as células foram semeadas em meio K+ e incubadas por 24 horas. Decorrido esse período, os poços foram lavados com solução fisiológica e o meio K+ foi substituído pelos mesmos meios apresentados na TAB.3. A partir de então, as células foram incubadas por períodos adicionais de 24, 48, 72 e 96 horas, após os quais efetuamos a medida de absorbância conforme descrito acima.

A viabilidade celular foi determinada pela relação:

$$VC(\%) = \left(\frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \right) \times 100$$

Onde: VC é viabilidade celular (%); $DO_{amostra}$ é densidade óptica da amostra; $DO_{controle}$ é a densidade óptica do controle.

A partir da decisão do melhor momento de adição de heparina, o lisado obtido com a técnica escolhida passou a ser denominado de LP.

4.6.2 Testes de substituição da insulina e omissão da toxina colérica

Estes testes seguiram a sequência descrita no item anterior (4.6.1), porém variando as concentrações e origem da insulina e omitindo toxina colérica (M10 a M18) conforme TAB.4.

TABELA 4. Meios com variação na concentração de insulina e omissão de toxina colérica

COMPONENTES	MEIOS								
	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18
Soro fetal bovino	10%	10%	10%	****	****	****	****	10%	****
Lisado de plaquetas B	****	****	****	5%	5%	5%	5%	****	5%
Insulina Bovina	****	****	****	5 µg/mL	****	****	****	5 µg/mL	5 µg/mL
Insulina Humana	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	****	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	****	****
Toxina Colérica	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	0,1 nM	****	****

4.6.3 Teste de variação da concentração de T3

Nesse experimento, onde as variáveis foram testadas de acordo com a TAB.5, o teste de adesão celular não foi realizado e a análise da comparação da viabilidade celular com os meios testados, em relação ao controle foi feita utilizando-se conjuntos de 5 poços submetidos ao teste de MTS (4.6.1).

TABELA 5. Meios com variação na concentração de T3

COMPONENTES	MEIOS					
	M19	M20	M21	M22	M23	M24
Lisado B	2,5%	2,5%	2,5%	5%	5%	5%
T3	20 pM	40 pM	80 pM	20 pM	40 pM	80 pM
Insulina Humana	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
Toxina Colérica	****	****	****	****	****	****

4.6.4 Teste de influência do tipo sanguíneo

As células testadas de acordo com as variáveis descritas na TAB.6, foram avaliadas quanto a sua capacidade de adesão e comparação de viabilidade em relação ao controle. Para isso, foram usados conjuntos de 6 poços por variável, que foram submetidos ao teste de MTS, a exemplo dos testes anteriores.

TABELA 6. Meios com variações de tipos sanguíneos

COMPONENTES	MEIOS				
	M25	M26	M27	M28	M29
Tipo A	5%	****	****	****	****
Tipo B	****	5%	****	****	****
Tipo AB	****	****	5%	****	****
Tipo O	****	****	****	5%	****
Pool	****	****	****	****	5%
Insulina Humana	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
Toxina Colérica	****	****	****	****	****

4.6.5 Teste de concentração dos lisados e de privação de EGF em culturas de baixa densidade

O teste para determinar a melhor concentração de lisado de plaquetas para culturas de baixa densidade, foi feito em 3 conjuntos de triplicatas (poços de 9,6 cm²) para cada variável, utilizando meio de cultura suplementado com lisado de plaquetas (do tipo sanguíneo O positivo) nas concentrações de 2,5%, 5% e 10%. Estes foram acompanhados por culturas controle (meio K+), também mantidas em 3 conjuntos de triplicatas.

Para a concentração de 10%, reservamos 3 conjuntos adicionais, nos quais omitimos a adição de EGF.

As culturas foram mantidas até que as células do controle atingissem a subconfluência da superfície da placa de cultura. Nesse momento, as primeiras triplicatas de cada grupo (2,5%, 5%, 10% com e sem EGF), foram fotografadas, destacadas do poço de cultura, por ação de tripsina, e contadas. As segundas triplicatas foram coradas no mesmo momento (Rhodamina B) e as terceiras, destinadas ao teste de eficiência de formação de colônias (3.5.1.).

Os queratinócitos humanos, utilizados na primeira passagem (P1), foram semeados na concentração de 5.000/cm² (baixa densidade) para as triplicatas destinadas a coloração e contagem e na concentração de 20 células/cm², para as triplicatas destinadas à eficiência de formação de colônias.

Fibroblastos humanos (20.000 por cm²), irradiados a 100 Gy, foram empregados como camada de sustentação para todos os testes, exceto para o controle que foi semeado com as células CCL-92 (25.000 por cm²) irradiadas à 60 Gy, como são tradicionalmente empregadas. Com exceção do soro fetal bovino e da insulina bovina, que aqui foi substituída pela recombinante humana, todos os outros componentes foram mantidos de acordo com o padrão.

4.6.6 Teste de privação da toxina colérica por 1 e 2 passagens de culturas em baixa densidade

Utilizando parte das culturas de queratinócitos do teste anterior (4.6.5) obtidos a partir do controle e dos poços cultivados em meio suplementado com lisado de plaquetas a 2,5%, foram ressemeados em 3 novos conjuntos de triplicatas, agora na segunda passagem. Desta vez, meios suplementados com lisado de plaquetas a 2,5% com e sem toxina colérica foram comparados ao controle. Este mesmo procedimento foi seguido para a terceira passagem, obtendo-se assim culturas mantidas por 2 passagens sem toxina colérica, para comparação com as culturas mantidas com toxina colérica e com o controle. A contagem, coloração e eficiência de formação de colônias foram feitos como no teste anterior.

Na terceira passagem, foi adicionada uma variável para a EFC, onde parte da cultura mantida em meio com toxina colérica foi dividida e cultivada sem TC para comparação intraensaio do meio adaptado por duas passagens sem TC.

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão das médias. Em uma etapa inicial, todos os valores foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias, usando o teste de Hartley, para verificar a distribuição normal dos resultados. A partir de então, foi feita a análise de variância, empregando-se os testes: (One-way ANOVA) para análises paramétricas ou (Kruskal Wallis ANOVA) para análises não paramétricas. Considerando-se estatisticamente significativos, valores $P < 0,05$, as diferenças entre as médias obtidas foram determinadas pelos testes de (Fisher LSD) para análises paramétricas ou (Kruskal Wallis) para análises não paramétricas. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o software estatístico STATISTICA v.7.1.

5 RESULTADOS

5.1 *Teste da determinação do momento da adição de heparina no preparo do lisado de plaquetas*

Uma vez que a adição de heparina é necessária para evitar a formação de coágulo e gelificação do meio de cultura, nosso primeiro teste visou estabelecer a melhor dose e o momento mais apropriado para adicioná-la ao concentrado de plaquetas e/ou ao meio de cultura. Para tanto, a heparina foi adicionada antes e após a lise das plaquetas (LPA), somente antes da lise (LPB) ou somente após a lise (LPC).

As observações feitas em cada ciclo de centrifugação evidenciaram as seguintes características (FIG 7) :

- Coágulos: não observamos o aparecimento de coágulos em qualquer momento ou circunstância.
- Agregados na superfície: amostras (LPA, LPB e LPC) provenientes de um mesmo doador, foram equivalentes entre si a cada ciclo de centrifugação. Apesar da pouca variação em cada bolsa utilizada, foram observadas quantidades diferentes de agregados entre doadores, independente da adição ou não de heparina.
- Quantidade de resíduos em suspensão: foi heterogênea entre as amostras, não sendo dependente do número de ciclos ou adição de heparina.
- Precipitado (botão celular): diminuiu progressivamente após cada ciclo de centrifugação, estando presente inclusive no último ciclo (4°C), ainda que em pequena quantidade.

Para os lisados do subgrupo LPC (não heparinizado), o volume do precipitado foi maior.

- Volume do sobrenadante: houve uma pequena diminuição no volume do sobrenadante entre a primeira e segunda centrifugação. Esta perda foi ainda menor após as terceira e quarta centrifugações.

Não foi detectada diferença considerável entre os três subgrupos de lisado (LPA; LPB e LPC).

FIGURE 1 – Observations made during feitas durante o preparo do lisado de plaquetas: resíduos em suspensão (seta branca), botão celular (seta verde) e agregados de superfície (seta vermelha).

5.2 *Teste da determinação do tipo e concentração do lisado em culturas em alta densidade*

Após obter os lisados, passamos a testar sua influência, nas concentrações de 2,5, 5 e 10%, sobre a adesão e a viabilidade dos queratinócitos humanos, comparando os resultados obtidos com aqueles alcançados por células cultivadas em meio de cultura padrão (K+) (FIG.8 e FIG.9). Para testar a eficiência dos lisados quanto à adesão celular, empregamos os testes estatísticos de Hartley, seguido pelos testes One way ANOVA e Fisher LSD. Já para a avaliação da viabilidade celular, empregamos o teste de Hartley seguido pelo teste Kruskal Wallis ANOVA.

FIGURA 8 - Teste de adesão dos queratinócitos após 24h de contato com os respectivos meios e em diferentes concentrações. A saber: Lisados A, B e C; concentrações de 10, 5 e 2,5% e como controles: meio contendo 10% de soro fetal bovino (K+) e meio sem soro (CØ). Resultado expresso em porcentagem de adesão em relação ao controle (K+).

Na FIG.8 observa-se que a taxa de adesão celular foi inversamente proporcional à concentração do lisado de plaquetas no meio de cultura, sendo que os lisados A, B e C na concentração de 2,5%, ($109,11 \pm 14,11\%$, $103,85 \pm 13,18\%$, $109,46 \pm 12,57\%$, respectivamente) o lisado A na concentração de 5% ($103,29 \pm 12,75\%$) e o controle sem soro (CØ) ($109,33 \pm 12,01\%$) foram equivalentes entre si e proporcionaram a melhor taxa de adesão celular. Não houve diferença significativa entre os lisados A, B e C quando estes foram comparados na mesma concentração.

FIGURA 9 - Teste de viabilidade dos queratinócitos, em comparação ao controle (K+), nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando os lisados A, B e C (LPA; LPB e LPC); concentrações 10, 5 e 2,5% e como controles: meio contendo 10% de soro fetal bovino (K+) e meio sem soro (CØ). Resultado expresso em porcentagem de viabilidade celular, em relação ao controle (K+).

Observa-se na FIG.9, que nas primeiras 24 horas, os lisados de plaquetas A, B e C equivaleram-se na concentração de 10% ($71,36 \pm 10,67\%$, $76,04 \pm 21,08\%$ e $76,83 \pm 11,61\%$, respectivamente) e exibiram a menor taxa de viabilidade celular que foi comparável com aquela alcançada por células cultivadas em meio suplementado com lisado de plaquetas A, na concentração de 5%. ($81,55 \pm 15,32\%$).

De uma maneira geral, essa tendência dos LPs 10% resultarem em menor taxa de viabilidade celular se manteve durante todo o estudo, assim como a semelhança entre os lisados B e C nas concentrações de 2,5% e 5%.

5.3 Teste de substituição da insulina bovina por insulina recombinante humana

Partindo-se dos resultados obtidos no item 5.1, onde verificamos que o momento de adição da heparina, não interfere no resultado da cultura dos queratinócitos e que estes podem ser cultivados com lisados de plaquetas na concentração de 5 ou 2,5%, passamos a testar as alterações provocadas pela utilização de insulina humana em diferentes concentrações, tanto na adesão

quanto na comparação, dia a dia, da proliferação celular em relação ao controle (FIG. 10 e 11). Para este teste, os dados paramétricos obtidos tanto para o ensaio de adesão quanto o de viabilidade celular, foram submetidos aos testes de Hartley, One way ANOVA e Fisher LSD.

FIGURA 10- Testes de adesão dos queratinócitos após 24h em contato com meios contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) ou 5% de lisado de plaquetas, ambos testados com diferentes concentrações de insulina recombinante humana (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$). Como controles, foram utilizadas células cultivadas em meios contendo 10% de soro fetal bovino (K+) ou 5% de lisado de plaquetas (LP), e insulina bovina na concentração padrão (5 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos como porcentagem de adesão celular em relação ao controle (K+). (●) = controle interno para os testes com insulina humana em meio com LP, (●) = controle interno para os testes com insulina humana em meio com SFB.

De acordo com a FIG.10, pudemos observar que, de um modo geral, as células cultivadas na presença de insulina recombinante humana tanto em meio suplementado com SFB quanto em meio suplementado com LP, tiveram taxa de adesão superior à daquelas células cultivadas em meio ao qual insulina bovina foi adicionada. Os dados apresentados revelam ainda, que células expostas a diferentes concentrações de insulina recombinante humana, tiveram taxa de adesão estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) quando comparadas entre si, porém superiores aos seus respectivos controles. Observa-se ainda que, o aumento da porcentagem de adesão das células cultivadas em meio contendo LP

e insulina recombinante humana, independente da concentração utilizada, levou a resultados estatisticamente comparáveis ao controle padrão (K+).

FIGURA 11 - Teste de viabilidade dos queratinócitos em comparação aos controles, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. As variáveis correspondem a meios compostos por 10% de soro fetal bovino ou 5% de lisado de plaquetas, com diferentes concentrações de insulina recombinante humana (2,5, 5 e 10 µg/mL). Como controles, foram utilizadas células cultivadas em meios contendo 10% de soro fetal bovino (K+) ou 5% de lisado de plaquetas, ambos contendo insulina bovina na concentração padrão (5 µg/mL). Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (K+).

Ao longo de 96 horas de estudo (Fig. 11) podemos afirmar, que salvo poucas exceções, os meios suplementados com LP ou SFB, tiveram respostas de viabilidade celular equivalentes, quando comparados entre si. Em um primeiro instante (24 horas), de uma maneira geral, os meios suplementados com LP foram os que exibiram resposta de média de viabilidade celular superiores e mais próxima ao controle ($104,77 \pm 6,67\%$), ao mesmo tempo em que se equivaleram aos meios suplementados com SFB. Porém, esta situação passou a se inverter a partir de 48 h, quando os meios suplementados com SFB passaram a exibir respostas similares ao controle ($100,00 \pm 6,13\%$) e superiores ou semelhantes, no caso de meio suplementado com SFB adicionado de insulina 1/2x ($97,74 \pm 7,22\%$), àqueles alcançados pelas células cultivadas em meios suplementados com LP. Após 72 h, a similaridade entre meios suplementados com SFB ou LP quando comparados entre si, ficou ainda mais evidente, assim como a superioridade dos primeiros em relação aos últimos independente da

concentração de insulina, fato já observado nos testes anteriores onde foram comparadas especificamente as culturas com meios utilizando lisados de plaquetas em relação aos meios com soro fetal bovino. A partir das 48 h até o final das 96 h os meios LP contendo insulina recombinante humana, proporcionaram viabilidade celular semelhante ao seu controle (LP suplementado com insulina bovina), independente da concentração utilizada. Em relação ao meio SFB, todas as concentrações de insulina recombinante humana levaram a viabilidade celular superior, durante o período de tempo estudado (24 a 96 h), quando comparados ao seu meio controle (K+).

5.3.1 Teste de variação na concentração de T_3

Após fixar a concentração de insulina humana testamos diferentes concentrações de T_3 , em meios suplementados com lisado de plaquetas a 2,5 e 5% (FIG.12), para verificar a influência desta juntamente com a insulina, em relação ao controle. Os testes estatísticos aplicados neste estudo foram p- Hartley, One way ANOVA e Teste de Fisher LSD.

FIGURA 12 - Teste de viabilidade dos queratinócitos em relação ao controle (K+), nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. As variáveis correspondem a meios contendo 2,5 ou 5% de lisado de plaquetas e as seguintes concentrações de T_3 : 20, 40 e 80 pM (1x, 2x, e 4x, respectivamente). Como controle, além do T_3 1x, foram utilizadas células cultivadas em meio K+. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (K+).

Como se observa na FIG.12, durante as primeiras 24 horas, a viabilidade celular utilizando T_3 nos meios de cultura suplementados com LP 2,5%, apesar de ter uma tendência a ser dose dependente, não teve uma variação significativa, assim como nos meios suplementados com LP 5%, onde já não se verifica nem a tendência à dependência da dose. A partir das 48 horas, a utilização de meios com diferentes concentrações de T_3 (1x, 2x e 4X) e de (LP 5% ou LP 2,5%), passou a resultar em respostas celulares semelhantes, até que ao final de 96 horas as variáveis testadas equivaleram-se entre si.

5.4 *Teste de omissão da toxina colérica*

Ainda a partir dos resultados obtidos no item 5.2, onde verificamos que o momento de adição da heparina, não interfere no resultado da cultura dos queratinócitos e que estes podem ser cultivados com lisados de plaquetas na concentração de 5 ou 2,5%, passamos a testar as alterações provocadas pela retirada da toxina colérica do meio de cultura, tanto na adesão quanto na comparação, dia a dia, da viabilidade celular em relação ao controle (FIG. 13 e 14). Para o teste de adesão foram empregados os testes p- Hartley, p- One way ANOVA e teste de Fisher LSD Para o teste de viabilidade, foram empregados o teste de Hartley seguido pelo teste de Kruscall Wallis.

FIGURA 13 - Testes de adesão dos queratinócitos após 24h em contato com meios contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) ou 5% de lisado de plaquetas (LP), ambos testados na ausência ou presença de toxina colérica. Como controles, foram utilizadas células cultivadas em meios contendo 10% de soro fetal bovino (K+) ou 5% de lisado de plaquetas e insulina bovina na concentração padrão (5 μ g/mL). Os resultados foram expressos como porcentagem de adesão celular em relação ao controle (K+). (●) = controle interno para a omissão de toxina colérica em meio com LP, (●) = controle interno para a omissão de toxina colérica em meio com SFB.

De acordo com a FIG.13, pudemos observar que, de um modo geral, a omissão da toxina colérica não resultou em alterações significativas na taxa de adesão celular.

FIGURA 14 - Teste de comparação da viabilidade dos queratinócitos na presença ou ausência de toxina colérica (Tc), nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, tanto em meio composto por 10% de soro fetal bovino, quanto em meio com 5% de lisado de plaquetas. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (K+).

Com base na FIG.14, pode-se verificar que nas primeiras 24 horas, a omissão da toxina colérica favoreceu a viabilidade celular, tanto para células cultivadas em meio suplementado com LP ($102,91 \pm 10,03\%$) como com SFB ($111,88 \pm 14,94\%$) sendo que para o meio suplementado com SFB, essa situação se manteve até o final do estudo ($116,25 \pm 15,16\%$). Para o meio suplementado com LP, a situação inicial se inverteu após 48 horas, ou seja, a viabilidade celular foi maior (7,33%) para as células cultivadas em presença de toxina colérica (TC), porém com os resultados de 72 e 96 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as viabilidades das células cultivadas nestes meios, na ausência ou presença da toxina colérica.

5.5 Teste de influência do tipo sanguíneo

Foi avaliada a possibilidade dos diferentes tipos sanguíneos, ou do pool obtido pela união deles (FIG.15 e 16), exercerem alguma influência sobre a viabilidade celular, em culturas de queratinócitos em alta densidade, após a padronização do lisado de plaquetas, da insulina humana e da toxina colérica. Para fins desta avaliação, empregamos os testes estatísticos p-Hartley, p-One way ANOVA e teste de Fisher LSD.

FIGURA 15. Teste de adesão dos queratinócitos após 24 horas de contato com meios suplementados com 5% lisado de plaquetas provenientes dos quatro tipos sanguíneos e do pool resultante da união dos mesmos. Como controle, foram utilizados queratinócitos cultivados em meio K+ e os resultados expressos em relação a estes.

FIGURA 16 - Teste de viabilidade dos queratinócitos em relação ao controle (K+), nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. As variáveis correspondem a meios contendo 2,5 ou 5% de lisado de plaquetas provenientes dos 4 tipos sanguíneos e o pool resultante da união dos mesmos. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (K+).

Na FIG.15, observamos que a influência do lisado de plaquetas do tipo O ($95,64 \pm 6,67\%$), resultou em taxa de adesão próxima ao controle ($100,00 \pm 5,29\%$), enquanto o pool ($109,52 \pm 7,39\%$) e os lisados de plaquetas do tipo AB ($111,52 \pm 5,75\%$) e B ($104,60 \pm 6,40\%$) foram equivalentes entre si e exibiram a melhor taxa de adesão celular. Já na FIG.16, onde avalia-se a viabilidade, ao longo do tempo, das células cultivadas na presença de lisados de plaquetas provenientes de diferentes tipos sanguíneos, nota-se que nas primeiras 24 horas, o lisado de plaquetas do tipo AB ($87,18 \pm 6,09\%$) teve uma viabilidade similar ao pool de lisados ($92,73 \pm 9,41\%$), assim como este teve valores similares ao controle ($100,00 \pm 7,16\%$). Uma pequena inferioridade dos resultados obtidos com os lisados em relação ao controle (K+) foi observada em 72 e 96 horas, variando de 4 a 16%. Entre os vários tipos de lisados, podemos observar que ao final do experimento os lisados de plaquetas do tipo A ($88,41 \pm 2,32\%$) e do tipo ($87,29 \pm 3,53\%$) não se enquadraram estatisticamente entre aqueles que exibiram os melhores resultados; porém a diferença entre suas médias e a maior média alcançada entre os lisados, obtida com a utilização do pool ($95,64 \pm 3,58\%$), foi discreta (por volta de 7%).

5.6 *Teste de concentração dos lisados em culturas em baixa densidade e de privação do EGF*

Levando em consideração que as culturas em baixa densidade levam a adição de mais uma variável, ou seja a camada de sustentação, se fez necessário determinar a melhor concentração do lisado de plaquetas a ser utilizado nesta condição de cultura, além de verificar a influência da quantidade de EGF, indiretamente aumentada pela adição deste lisado, que contem esse fator de crescimento. Para tanto foram comparadas as quantidades de células em cultura, para cada variável, no momento em que o controle atingiu a subconfluência (FIG. 17) e avaliadas as colônias formadas no ensaio de Eficiência de Formação de Colônias (EFC) (FIG. 18). Foi também avaliada a morfologia destas células em cultura e comparadas às suas respectivas EFC (FIG. 19).

FIGURA 17 - Média de contagem das células (n=3), nas células cultivadas em meios suplementados com LP a 10% sem EGF e com EGF (10ng/mL), meios suplementado com LP 5% com EGF (10ng/mL), meio suplementado com LP 2,5% com EGF (10ng/mL) e meio controle (K⁺).

FIGURA 18 - Ensaios de eficiência de formação de colônias, no qual foram testados os meios suplementados com lisado de plaquetas com concentrações de 2,5%, 5 e 10%, sendo que na concentração de 10%, com e sem adição de EGF) além do controle (K+). Os resultados foram expressos como a porcentagem de colônias totais e abortivas em relação à quantidade de células semeadas.

Com base nos resultados observados nas FIG. 17 e 18 e nas imagens expostas na FIG.19, podemos verificar que a maior quantidade de colônias com maior potencial proliferativo foi observada na condição em que o LP foi empregado na concentração de 2,5%. Observa-se ainda, que células cultivadas na presença de LP 10%, geraram colônias com baixo potencial proliferativo, sendo que esta resposta foi intensificada pela adição de EGF ao meio de cultura.

FIGURA 19 - Eficiência de Formação de Colônias (após 14 dias) e fotos de suas respectivas células, após 7 dias em cultura (aumento 100X). As variáveis correspondem a: (A) meio suplementado com LP 10% com EGF (10 ng/mL); (B) meio suplementado com LP 10% sem EGF; (C) meio suplementado com LP 5% com EGF (10 ng/mL); (D) meio suplementado com LP 2,5% com EGF (10 ng/mL); (E) controle (meio K+).

5.7 Teste de privação da toxina colérica por 1 e 2 passagens de culturas em baixa densidade

O teste de omissão da toxina colérica, já feito em alta densidade e na presença de LP a 5% (5.4), não resultou em prejuízo à adesão ou viabilidade celular. Com a presença da camada de sustentação e lisado de plaquetas a 2,5%, tido como a melhor concentração de lisado para esta condição (5.6), os efeitos da omissão da toxina foram novamente testados, durante 1 e 2 passagens (FIG. 20 e 21).

FIGURA 20 - Eficiência de Formação de Colônias (14 dias) e fotos de suas respectivas células (queratinócitos humanos na segunda passagem) após 8 dias em cultura (aumento 100X). As variáveis correspondem a: (F) meio suplementado com LP 2,5% sem toxina colérica; (G) meio suplementado com LP 2,5% com toxina colérica (0,1 nM); (H) controle (K+).

FIGURA 21 - Eficiência de Formação de Colônias (14 dias) e fotos de suas respectivas células (queratinócitos humanos na terceira passagem) após 11 dias em cultura (aumento 100X). As variáveis correspondem a: (I) meio suplementado com LP 2,5% sem toxina durante 1 passagem; (J) meio suplementado com LP 2,5% sem toxina colérica durante 2 passagens; (K) meio com toxina colérica (0,1 nM); (L) controle (K+).

A imagem (FIG.20-F) revela que a omissão da toxina colérica resultou em prejuízo à viabilidade celular, representado pelo menor número de colônias em desenvolvimento em relação a condição na qual a toxina está presente e ao controle. Na passagem seguinte (FIG.21-J) esta diferença foi menos evidente com o aparecimento de algumas colônias semelhantes àquelas originadas por células cultivadas em meio com toxina colérica.

Quando observamos os gráficos numéricos de ambos os experimentos, ou seja, número de células na subconfluência (FIG. 22), EFC (FIG. 23) e número de duplicações ao longo do tempo (FIG. 24), os mesmos resultados podem ser observados, embora um declínio geral da viabilidade celular após a 2ª passagem, também seja evidente.

FIGURA 22 – Gráfico correspondente à média de contagem das células (n=3), nas diferentes passagens e condições: (P1) células cultivadas em meio suplementado com LP 2,5% com toxina colérica (0,1 nM) e meio controle (K+); (P2) células cultivadas em meios suplementados com LP 2,5% sem e com toxina colérica (0,1 nM) e meio controle (K+); (P3) células cultivadas em meios suplementados com LP 2,5% sem toxina colérica durante 2 passagens, meio suplementado com LP 2,5% com toxina colérica (0,1 nM) e meio controle (K+).

FIGURA 23 - Ensaios de eficiência de formação de colônias, nos quais foram testadas as seguintes variáveis: (P1) meios suplementados com lisado de plaquetas 2,5%, com TC (P2) meios suplementados com lisado de plaquetas 2,5%, com e sem toxina colérica (TC); (P3) meios suplementados com lisado de plaquetas 2,5% com TC, sem TC durante 1 passagem e sem TC durante 2 passagens. Todas as passagens contaram com controle (K+), com o qual as variáveis foram comparadas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de colônias totais e abortivas em relação a quantidade de células semeadas.

FIGURA 24 – Gráfico correspondente ao número de duplicações dos queratinócitos versus o tempo gasto para atingir estas duplicações, nas diferentes condições: (7 dias) células cultivadas em meio suplementado com LP 2,5% com toxina colérica (0,1 nM) e meio controle (K+); (15 dias) células cultivadas em meios suplementados com LP 2,5% sem e com toxina colérica (0,1 nM) e meio controle (K+); (26 dias) células cultivadas em meios suplementados com LP 2,5% sem toxina colérica durante 2 passagens, meio suplementado com LP 2,5% com toxina colérica (0,1 nM) e meio controle (K+).

6 DISCUSSÃO

A obtenção de epitélios confluentes de queratinócitos autólogos, aplicados como enxerto em diversas situações clínicas^{4,10,11}, requer a utilização de componentes xenobióticos, o que representa um potencial risco de transmissão de zoonoses, príons e viroses animais aos pacientes^{9,12}. Desta forma, a utilização desses componentes deve ser evitada⁷⁹.

O lisado de plaquetas humanas surgiu como uma das alternativas ao soro fetal bovino, pelo fato das plaquetas conterem, em seus grânulos, diversos fatores de crescimento (TAB. 1) envolvidos na reparação tissular^{16,17}. A liberação do conteúdo desses grânulos no meio sobrenadante pode ser alcançada por ciclos de congelamento e descongelamento ou pela adição de trombina⁷⁷. O método que ativa a degranulação através de ciclos de congelamento e descongelamento mostra-se superior quanto a quantidade de fatores de crescimento liberados⁷⁷. Em contrapartida, o método que utiliza a adição de trombina é considerado mais próximo à ativação fisiológica normal das plaquetas e portanto, assegura a bioatividade dos fatores de crescimento liberados⁷⁹. Como a trombina utilizada para degranulação das plaquetas é de origem bovina, sua utilização iria contra o propósito deste trabalho, por isso optamos por lisar as plaquetas por meio de 4 ciclos consecutivos de congelamento (-70 °C por 6 horas) e descongelamento (37 °C- durante 15 minutos) e posteriormente, submeter as amostras a 4 procedimentos de centrifugação (3615 g por 30 minutos), para remover restos das plaquetas lisadas. Este protocolo, semelhante aquele proposto por Blande⁸¹, parece ter sido eficiente para a lise das plaquetas e as 4 centrifugações realizadas mostraram-se necessárias por ser possível observar o botão celular (FIG. 7, seta verde) até o final do procedimento, mesmo que em pequenas dimensões.

Já a heparina, apesar de ser de origem xenobiótica, tem sido rotineiramente utilizada em práticas clínicas. Ainda assim, a busca por alternativas que possam substituí-la, faz parte de nossos planos futuros.

Uma vez que a adição de heparina é necessária para evitar a formação de coágulo e gelificação do meio de cultura, nos preocupamos em estabelecer o momento mais apropriado para adicioná-la ao concentrado de plaquetas e/ou ao meio de cultura. Para tanto, a heparina foi adicionada antes da lise e durante o preparo do meio de cultura (LPA), somente antes da lise (LPB) ou não foi adicionada ao lisado, sendo acrescida apenas ao meio de cultura durante o seu preparo(LPC). Após cada centrifugação, foram observadas as variações das quantidades de coágulos, agregados de superfície, resíduos em suspensão, botão celular e volume de sobrenadante (FIG. 7). De maneira geral, todos os parâmetros foram decrescendo, porém não foi observada nenhuma relação com o momento da adição de heparina.

Tendo os três tipos de lisado (LPA, LPB e LPC) em mãos, passamos a avaliar a sua influência nas concentrações de 10%, 5% e 2,5%, sobre a adesão e viabilidade de queratinócitos humanos, testados inicialmente em alta densidade.

O fato da porcentagem de adesão celular ter sido inversamente proporcional a concentração dos LPs no meio de cultura e do CØ ter mostrado resultados comparáveis àqueles alcançados por LP na menor concentração (2,5%) (FIG.8), nos levou a presumir que o lisado de plaquetas contém algum fator que interfira na adesão celular, embora saiba-se que a fibronectina, um fator de adesão celular^{13,14}, esteja presente.

Hipoteticamente, a heparina pode ter exercido este papel de interferir na adesão celular, já que segundo dados encontrados na literatura⁹⁹, pode ter um efeito variável sobre a adesão dos queratinócitos, dependendo de sua concentração e das condições de cultura.

O declínio da viabilidade celular, em relação aos controles, observada ao longo de 96 horas, para todas as concentrações de lisado (FIG.9) indica que a troca do meio de cultura suplementado com lisado de plaquetas a cada 48 h, é crucial para o desenvolvimento da cultura, ao passo que a maior taxa de viabilidade celular, alcançada pelo meio controle sem soro (CØ) observada no mesmo intervalo de tempo, pode dever-se a fatores autócrinos produzidos por células cultivadas neste meio. Apesar dos resultados obtidos com o emprego CØ,

terem sido favoráveis ao longo de 96 h, a sua aplicação não seria recomendável na prática laboratorial diária, visto que rotineiramente, os queratinócitos são cultivados por períodos mais longos. Nota-se, ainda no mesmo experimento, que os lisados LPB e LPC nas concentrações de 2,5 e 5%, mostraram respostas equivalentes quanto a viabilidade celular, ainda que esses resultados sejam inferiores a viabilidade conquistada pelo controle. Devido a essa observação e ao fato do preparo do LPB ser o de maior praticidade, passamos a adotá-lo para a realização dos experimentos seguintes, denominando-o a partir de então somente LP.

A insulina de origem bovina é outro componente xenobiótico tradicionalmente empregado na cultura de queratinócitos. O papel da insulina é controverso, entre os autores, alguns não encontram vantagens em utilizá-la⁴⁸ enquanto outros, a consideram um hormônio essencial para a duplicação de quase todas as células em cultura¹⁰⁰.

Neste trabalho, a insulina bovina foi substituída por insulina recombinante humana, testada na mesma concentração (5 µg/mL) de sua antecessora e também em concentrações que correspondem a metade e ao dobro desse valor (FIG. 10). Os testes de adesão evidenciaram que a presença de insulina recombinante humana, independentemente da concentração utilizada, melhorou a taxa adesão celular tanto para as células cultivadas em meio suplementado com lisado de plaquetas na concentração de 5%, quanto em meio suplementado com soro fetal bovino, sendo que na presença do soro fetal bovino, esta melhora foi mais evidente. Em continuidade a este ensaio, observamos que a partir de 48 h a adição de insulina humana, independente de sua concentração, ao meio suplementado com LP, resulta em respostas similares àquelas obtidas com o emprego da insulina bovina na mesma condição (controle interno – FIG.11), de modo que ela pode ser utilizada em substituição a sua antecessora, no meio suplementado com LP, sem que essa alteração cause prejuízo à viabilidade celular. As diferentes concentrações do hormônio não resultaram em respostas estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

De acordo com dados encontrados na literatura, a T_3 em associação com a insulina e transferrina, permite a redução da quantidade de soro fetal empregado na confecção do meio de cultura e ainda compensa variações existentes entre diferentes lotes de soro⁴⁵. Após determinar que a insulina humana pode ser utilizada na concentração de (5 $\mu\text{g/mL}$), sobre meio de cultura suplementado com lisado de plaquetas a 5%, passamos a testar também diferentes concentrações de T_3 , sobre células cultivadas em meios suplementados com lisado de plaquetas a 2,5% e 5% (FIG.12), mas as diferentes concentração do lisado e de T_3 , não provocaram alterações no comportamento celular, sugerindo que um aumento da concentração deste hormônio, além daquela tradicionalmente empregada (20 pM), não resultou em benefícios adicionais à viabilidade quando comparada ao controle. Desta forma para os testes seguintes, mantivemos a T_3 e a insulina em suas concentrações padrão (20 pM e 5 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente.

A toxina colérica merece consideração a parte. Segundo dados encontrados na literatura, ela aumenta a taxa de proliferação celular e melhora a eficiência de formação de colônias. Além disso, a toxina colérica ativa a adenil ciclase de forma irreversível, de modo que a multiplicação celular continua, mesmo depois da mesma ser retirada do meio de cultura⁴⁶, razão pela qual propusemos a sua omissão neste estudo.

Nossos resultados parecem estar em acordo com essa afirmação, já que a omissão da toxina não resultou em danos à adesão (FIG. 13) ou viabilidade celular (FIG. 14), indicando que ela possa ser omitida do meio de cultura quando utilizamos queratinócitos em alta densidade. Este resultado corrobora o trabalho de Formanek e colaboradores que ao estudarem os aditivos utilizados na cultura de queratinócitos, individualmente e em diversas combinações, demonstraram que a adenina, a transferrina e a toxina colérica, não apresentaram efeitos que estimulassem o crescimento dos queratinócitos¹⁰¹.

A maior parte dos lisados de plaquetas preparados para este estudo foi proveniente de bolsas de concentrado de plaquetas do tipo A ou O positivos, por serem os tipos de maior prevalência entre a população brasileira e

consequentemente, aqueles que obtivemos em maior quantidade para a realização dos experimentos propostos.

O teste de influência dos tipos sanguíneos (FIG.15 e 16) foi feito pensando na aplicação clínica dos enxertos, que devem ser cultivados, preferencialmente, em meio de cultura enriquecido com lisado de plaquetas autólogas, desde que as condições clínicas do paciente assim o permitam. Tivemos como resposta para este teste, que os queratinócitos podem ser cultivados em meio suplementado com lisado de plaquetas proveniente de qualquer um dos tipos sanguíneos e também do pool obtido a partir da união deles, apesar do lisado de plaqueta proveniente do tipo sanguíneo O, ter exibido adesão e viabilidade estatisticamente inferiores quando comparado ao controle e aos demais lisados.

Os resultados apresentados até aqui, que normalmente foram similares ou inferiores (por volta de 80%) ao controle, podem não ter sido melhores devido à ausência de uma camada de sustentação, cuja humanização foi padronizada em trabalho paralelo¹⁰² e empregada nos experimentos a partir de então.

A presença de EGF no lisado de plaquetas levantou a questão se um aumento na concentração deste fator, obtido pela adição do lisado ao meio de cultura, implicaria em alterações na viabilidade celular. Para esclarecer essa dúvida e para determinar a concentração mais adequada de lisado de plaquetas para a cultura de queratinócitos em baixa densidade (sobre camada de sustentação), comparamos as Eficiências de Formação de Colônias de células cultivadas em meio de cultura contendo lisado de plaquetas nas concentrações de 2,5%, 5 e 10%, sendo que os meios preparados na concentração de 10% foram acrescidos de EGF recombinante humano (10 ng/ mL) a exemplo dos demais meios, ou suprimidos destes (FIG. 17 e 18). A resposta obtida foi uma viabilidade celular inversamente proporcional à concentração do lisado presente no meio e a adição de EGF ao meio suplementado com LP 10%, só fez aumentar ainda mais essa discrepância (FIG. 19). Estes resultados corroboram de certa maneira, com aqueles obtidos por Formanek e colaboradores¹⁰¹. Estes pesquisadores, ao compararem o efeito do EGF em diversas concentrações (0,3; 3; 10 e 15 ng/mL),

encontraram maior efeito proliferativo quando a concentração de EGF 10 ng/mL foi empregada¹⁰¹.

Ao contrário do que ocorreu em alta densidade, as células cultivadas na presença LP 2,5% e sobre camada de sustentação, tiveram viabilidade similar àquela alcançada por células cultivadas em meio controle, superando estas durante a segunda e terceira passagens (FIG. 17 a 19). Este comportamento indica que, além da troca de meio ser primordial a cada 48 horas, a camada de sustentação também tem papel importante, uma vez que na sua ausência, a viabilidade das células cultivadas em meios suplementados com lisado de plaquetas não chegou a superar àquela alcançada por células cultivadas em meio controle (K+).

A omissão de toxina colérica, uma das propostas deste estudo, já foi testada em culturas em alta densidade e com concentração de LP a 5%, obtendo-se nessas condições, uma viabilidade celular semelhante a do controle (item 5.4). Dado que testes posteriores revelaram um melhor rendimento celular na presença de camada de sustentação e de meio de cultura suplementado com LP a 2,5%, realizamos novos testes, onde avaliamos a omissão de toxina colérica por uma e duas passagens, respeitando as novas condições (FIG. 20 e 21).

A imagem (FIG. 20-F) revela que a omissão da toxina colérica resultou em prejuízo à viabilidade celular em um primeiro instante; porém, dando continuidade ao experimento, observa-se uma recuperação das células submetidas a essa condição na passagem seguinte (FIG. 20-J) voltando a exibir resultados semelhantes às células cultivadas em meio contendo a toxina.

Estes resultados podem ser observados de forma quantitativa nas FIG. 22, 23 e 24, embora um declínio geral da viabilidade celular após a 2ª passagem, também seja evidente.

7 CONCLUSÃO

A omissão ou substituição dos componentes xenobióticos empregados no meio de cultura para queratinócitos humanos foi possível, sendo mais eficiente quando estas culturas foram mantidas em camada de sustentação de fibroblastos humanos irradiados, principalmente após um período inicial de adaptação das células ao novo meio de cultura.

O meio de cultura livre de componentes xenobióticos foi resultante das seguintes modificações:

O método padronizado para a obtenção do lisado de plaquetas (LP) constou de adição de heparina (100 UI/mL) e 4 ciclos de congelamento e descongelamento (-70 °C por 6 horas e 37 °C por 15 minutos, respectivamente) seguidos de 4 ciclos de centrifugação (3615 g, 30 minutos).

Apesar de ser possível a utilização de 5% do lisado de plaquetas no meio de cultura de queratinócitos em alta densidade, a concentração de 2,5% pode ser empregada tanto para culturas em alta densidade (condição que na ausência da camada de sustentação) quanto para culturas em baixa densidade em presença de camada de sustentação de fibroblastos humanos irradiados, sendo que neste caso com uma viabilidade superior ao método convencional

A utilização de lisado de plaquetas autólogas é possível e recomendável. Sendo também possível, para a diminuição da variabilidade de testes "*in vitro*", a utilização de lisados de plaquetas provenientes de diferentes tipos sanguíneos ou a união dos mesmos (*pool*).

A substituição da insulina bovina por insulina recombinante humana foi satisfatória, podendo ser utilizada na mesma concentração do método original (5 µg/mL).

Foi possível omitir a toxina colérica tanto para as culturas de alta densidade, quanto para as culturas sobre camada de sustentação.

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP
Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF. COEP/448/10

17 de dezembro de 2010.

Prezadas pesquisadoras e orientadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP analisou, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - CNS e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º 2177, intitulado **"SUBSTITUIÇÃO DOS COMPONENTES XENOBIÓTICOS DAS CULTURAS DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS HUMANOS"**, área temática **GRUPO III**, sob responsabilidade das pesquisadoras **Daniele Yoshito e Silvana Cerejido Altran** e orientação da Doutora **Monica Beatriz Mathor**, considerando-o **APROVADO "AD REFERENDUM"**.

Cabe lembrar que, conforme a Resolução CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a):

1. Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa;
2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria;
3. Comunicar formalmente a este Comitê quando houver o encerramento da pesquisa;
4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e final;
5. Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Claudio Leone
 Professor Titular
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilma. Sra.
 Dra. Monica Beatriz Mathor
 Centro de Tecnologia das Radiações - CTR
 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP

Av. Dr. Arnaldo, 715 - Cerqueira César - CEP 01246-904 - São Paulo - SP
 Contato: (55 11) 3061 3779 | coep@fsp.usp.br | www.fsp.usp.br

Aprovação homologada na 1ª/11 Sessão Extraordinária em 14/01/2011

ANEXO B

Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/10/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0515/10**, intitulado: "**SUBSTITUIÇÃO DOS COMPONENTES XENOBIÓTICOS EMPREGADOS NO MEIO DE CULTURA PARA MANUTENÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS, POR SIMILARES DE ORIGEM HUMANA.**" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Cesar Isaac**

Pesquisador (a) Executante: **Silvana Cereijido Altran**

CAPPesq, 29 de Outubro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ HOLBROOK, A.K.; WOLFF, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.M.; AUSTEN, F.K. (Ed.). ***Dermatology in general medicine***: textbook and atlas. New York, N.Y.: McGraw-Hill, 1987. v.1. p. 93-131.
- ² ECKERT, R.L. Structure,function and differentiation of the keratinocyte. ***Physiol. Rev.***, v. 69, n. 4, p. 1316-1346, 1989.
- ³ PEYREFITE, G. Estrutura e fisiologia da pele. In: PEYREFITE, G.; MARTININ, M.C.; CHIVOT, M. (Ed.). ***Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele***. São Paulo: Andrei, 1998. Parte 3, p. 329-477.
- ⁴ HERSON, M.R. ***Estudo da composição in vitro de substituto cutâneo dermo-epidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena***. 1999. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ⁵ O'CONNOR, N.E.; MULLIKEN, J.B. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. ***Lancet***. v.1, p. 75-78, 1981.
- ⁶ RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. ***Cells***, v. 6, n. 3, p. 317 – 330, 1975 a.
- ⁷ RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of human epidermal keratinizing colonies from single cells. ***Cells***, v. 6, n. 3, p. 331-334, 1975 b.
- ⁸ RHEINWALD, J.G. Methods for clonal growth and serial cultivation of human epidermal keratinocytes and mesothelial cells. In: BARSEGA, R. (Ed.). ***Cell growth and division: a practical approach***. Oxford, OH.: Oxford University Press, 1989
- ⁹ SUN,T.; HIGHAM, M.; LAYTON, C.; HAYCOCK, J.; SHORT, R.; MACNEIL, S. Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use. ***Wound Repair. Regen.***, v.12, n. 6, p. 626-634, 2004.
- ¹⁰ DE LUCA, M.; CANCEDDA, R., Culture of human epithelium. ***Burns***, v. 18, p. s5-s10, 1992. Supplement 1.
- ¹¹ DE LUCA, M.; ALBANESE, E.; CANCEDDA, R.; VIACAVA, A.; FAGGIONI, A.; ZAMBRUNO, G.; GIANNETTI, A. Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogenic cultured epithelium. ***Arch. Dermatol.***, v. 128, n. 5, p. 633 – 638, 1992.
- ¹² MANNELLO, F.; TONTI, G.A. No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer or feeder-free;medium with foetal calf serum, human serum or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium or ad-hoc formula? All that glitters is not gold! ***Stem Cells***, v. 25, n.7, p. 1603-1609, 2007.

-
- ¹³ ALDÉN, A.; GONZALES, L.; PERSSON, A.; CHRISTENSSON, K.; HOLMQVIST, O.; OHLSON, S. Porcine platelet lysate as supplement for animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 55, p. 3-8, 2007.
- ¹⁴ JOHANSSON, L.; KLINTH, J.; HOLMQVIST, O.; OHLSON, S. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? **Cytotechnology**, v.42, p. 67-74, 2003.
- ¹⁵ EPPLEY, B.L.; WOODEL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma, implications for wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 11, n. 4, p. 1502 – 1508, 2004.
- ¹⁶ KAPLAN, D.R.; CHAO, F.C.; STILES, C.D.; ANTONIADES, H.N.; SCHER, C.D. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. **Blood**, v. 53, p. 1043 – 1052, 1979.
- ¹⁷ LEDENT, E.; WASTESON, A.; BERLIN, G. Growth factor release during preparation and storage of platelet concentrates. **Vox. Sang.**, v. 68, p. 205-209, 1995.
- ¹⁸ COOLEN, N.A.; ULRICH, M.M.W.; MIDDELKOOP, E. Future perspectives of tissue-engineered skin: xenobiotic-free culture systems. In: CHANDAN . K. (Ed.). **Advances in wound care**. New Rochelle, N.Y.: Mary Ann Liebert, Inc, 2010. v. 1. p. 432-437.
- ¹⁹ GARTNER, L.P.; HIATT, J. **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- ²⁰ YOUNG, B.; HEATH, J.W.; STEVENS, A.; LOWE, J.S. Pele. In: YOUNG, B.; HEATH, J.W.; STEVENS, A.; LOWE, J.S. **Histologia funcional: texto e atlas em cores**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara-Koogan, 2001. p. 157- 171.
- ²¹ JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara Koogan, 1995. p. 301-312.
- ²² KESSEL, G.R. O tegumento. In: KESSEL, G.R. **Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara-Koogan, 2001. p.318-331.
- ²³ OWENS, D.M.; WATT, M.F. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, n. 6, p. 444-451, 2003.
- ²⁴ RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. **Nature**, v. 265, p. 421-424, 1977.
- ²⁵ LAVKER, R.M.; SUN, T.T. Epidermal stem cells. **J. Invest .Dermatol.**, v. 81, p. 121s-127s, 1983. Supplement 1.
- ²⁶ LAVKER, R.M.; MILLER, S.; WILSON, C.; COSTARELIS, G.; WEI, Z.G.; YANG, J.S. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 101, p. 16s – 26s, 1993. Supplement 1.
- ²⁷ WATT, F.M. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 11, p. 410-417, 2001.

-
- ²⁸ FUCHS, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. **J. Cell. Biol.**, v. 111, n. 6, p. 2807-2814, 1990.
- ²⁹ OVALLE, K.M.; NAHIRNEY, P.C. Integumentary system. In: OVALLE, K.M.; NAHIRNEY, P.C. **Netter's essential histology**. Philadelphia, PA.: Elsevier, 2008. p. 243 – 261.
- ³⁰ POIRIER, J.; DUMAS, J.L.R.; CATALA, M.; ANDRÉ, J.M.; GHERARDI, R.K.; BERNAUDIUM, J.F. A diferenciação e renovação celular. In: POIRIER, J.; DUMAS, J.L.R.; CATALA, M.; ANDRÉ, J.M.; GHERARDI, R.K.; BERNAUDIUM, J.F. In: **Histologia molecular**: texto e atlas. São Paulo, SP.: Santos, 2003. p. 31-44.
- ³¹ PRIESTLEY, G.C. Na introduction to skin and its diseases. In: PRIESTLEY, G.C. **Molecular aspects of dermatology**. New York, N.Y.: Chichester:John Wiley & Sons Ltd, 1993. p. 1-17.
- ³² DE LUCA, M.; FRANZI, A.T.; D'ANA, F.; ZICCA, A.; ALBANESE, E.; BONDANZA, S.; CANCEDDA, R. Coculture of human keratinocytes and melanocytes: differentiated melanocytes are physiologically organized in the basal layer of the cultured epithelium. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 46, p. 176-180, 1988.
- ³³ ROCHAT, A.; KOBAYASHI, K.; BARRADON, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analyses. **Cell**, v. 76, p. 1063-1073, 1994.
- ³⁴ PRESLAND, R.B.; JUREVIC, R.J. Making sense of epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. **J. Dent. Educ.**, v. 66, n. 4, p. 564-574, 2002.
- ³⁵ SQUIER, C.A.; FINKELTEIN, M.W. Mucosa bucal. In: CATE, R.T.(ED.). **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara-Koogan, 2001. p. 323-359.
- ³⁶ CHEN, S.Y. ; SQUIER, C.A. The ultrastructure of the oral epithelium. In: CHEN, S.Y.; SQUIER, C.A. **The structure and function of oral mucosa**. New York, NY Pergamon, 1984. p. 7-30.
- ³⁷ FUSENIG, N.E. Cell interaction and epithelial differentiation. In: FRESHNEY, R.I. (Ed.). **Culture of epithelial cells**. New York, NY.: Willey-Liss, 1992. p. 25-57.
- ³⁸ SCHROEDER, H.E. Oral mucosa. In: SCHROEDER, H.E. **Oral structural biology**. New York, NY.: Thieme Medical, Inc, 1991. p. 350-387.
- ³⁹ PRUNIÉRAS, M.; RÉGNIER, M.; FOUGÈRE, S.; WOODLEY, D. Keratinocytes synthesize basal-lamina proteins in culture **J. Invest. Dermatol.**, v. 81, p. 74s – 81s, 1983. Supplement 1.

-
- ⁴⁰ TIDMAN, M.J. The epidermal basement membrane. In: In: PRIESTLEY, G.C. (Ed.). **Molecular aspects of dermatology**. New York, N.Y.: Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1993. p. 75-88.
- ⁴¹ YOUNG, B.; HEATH, J.W.; STEVENS, A.; LOWE, J.S. Tecidos conjuntivos de sustentação. In: YOUNG, B.; HEATH, J.W.; STEVENS, A.; LOWE, J.S. **Histologia funcional: texto e atlas em cores**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara-Koogan, 2001. p.65-79.
- ⁴² BRIGGAMAN, R. A.; WHEELER JR, C. E. The epidermal-dermal junction. **J. Invest. Dermatol.**, v. 65, n.1, p. 71-84, 1975.
- ⁴³ VALK, van der J.; BRUNNER, D.; De SMET, K.; SVENNINGSEN, FEX .A.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L.E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M.L.; GSTRAUNTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicol. in vitro**, v. 24, p. 1053-1063, 2010.
- ⁴⁴ FRESHNEY, R.I. Defined media and supplements. In: FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 2005. p. 115-128
- ⁴⁵ PARKINSON, E.K.; YEUDALL, W.A. The epidermis. In: FRESHNEY, R.I. (Ed.). **Culture of epithelial cells**. New York, N.Y.: Wiley-Liss, 1992. p. 59-80.
- ⁴⁶ GREEN, H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new review. **Cell**, v. 15, p. 801-811, 1978.
- ⁴⁷ GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Cell Biology**, v. 76, n.11, p. 5665-5668, 1979
- ⁴⁸ BREIDAHN, A.F.; JUDSON, R.T.; CLUNIE, J.A. Review of keratinocyte culture techniques: problems of growing skin. **Aust. N. Z. J. Surg.** v. 59, p. 485-497, 1989.
- ⁴⁹ MAURER, R. H. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In: FRESHNEY, R.I. (Ed.) **Animal cell culture: a practical approach**. New York, N.Y.: Oxford University, 1992. p. 15-46.
- ⁵⁰ SHIPLEY, G.D.; PITTELKOW, M.R. Controlo f growth and differentiation in vitro human keratinocytes culture in serum-free medium. **Arch. Dermatol**, v. 123, p. 1541a-1544a, 1987.
- ⁵¹ ANDREASSI, L. History of keratinocyte cultivation. **Burns**, v. 18, p. s2-s4, 1992. Supplement 1.
- ⁵² CARREL, A.; BURROWS, M.T. Cultivation of adult tissues and organs outside the body. **JAMA**, v. 55, n.16, p. 1379 - 1381 , 1910.

-
- ⁵³ WAYMOUTH, C. Construction and use of synthetic media. In: WILLMER, E.N. (Ed.). **Cells and tissues in culture**. London, Engl.: Academic, 1965. v. 1. p. 99 – 105.
- ⁵⁴ BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**, v. 27, n. 1, p. 53-62, 2010.
- ⁵⁵ FALKNER, E.; APPL, H.; EDER, C.; LOSERT, U.M.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W. Serum free cell culture: the free online access database. **Toxicol. in vitro**, V. 20, p. 395-400, 2006.
- ⁵⁶ VALK, J. van der.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; FISCHER, R.; GRUBER, F.; GSTRAUNTHALER, G.; HELLEBREKERS, L.; HYLLNER, J.; JONKER, F.H.; PRIETO, P.; THALEN, M.; BAUMANS, V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicol. in vitro**. v. 18, n. 1, p. 1-12, 2004.
- ⁵⁷ OLIVEIRA, M.R.A.A. Plaquetas e púrpuras. In: OLIVEIRA, M.R.A.A. **Hematologia básica: fisiopatologia e estudo laboratorial**. São Paulo, SP.: Americanan Med, 1998, p. 163-191.
- ⁵⁸ SANTOS, M.D.; SANTOS DE DEUS, M.D. O sangue e a medulla óssea. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. (Ed.). **Plasma rico em plaquetas PRP e fatores de crescimento das pesquisas científicas à clínica odontológica**. São Paulo, SP.: Santos, 2004, p. 3-44.
- ⁵⁹ VERRASTRO, T. Hemostasia. In: VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. (Ed.). **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. São Paulo, SP.: Atheneu, 1998. p. 179-191
- ⁶⁰ LORENZI, T.F. Hemopoese. Origem das células do sangue. Citologia das células do sangue e dos órgãos hemoformadores. In: LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara-Koogan, 2006. p. 1-43.
- ⁶¹ HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E.; VYAS, P. Vascular and platelet bleeding disorders. In: HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E.; VYAS, P. **Color atlas of clinical hematology**. Philadelphia, PA.: Mosby Elsevier, 2002. p. 429-443.
- ⁶² LORENZI, T.F. Hemostasia. In: LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara-Koogan, 2006. p.44-195.
- ⁶³ EPPLEY, B.L.; PIETRAZAK, W.S.; BLATON, M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 118, n. 6, p. 147e-159e, 2006.
- ⁶⁴ EVERTS, P.A.M.; KNAPE, J.T.A.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J.P.A.M.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E.P.; BOX, H.A.M.; van ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J. Extra. Corpor. Technol.**, v. 38, p. 174-187, 2006.
- ⁶⁵ MILLER, O. Estudo da hemostasia. In: MILLER, O. **Estudo da hemostasia**. São Paulo, SP.: Atheneu, 1999, p. 88-97.

-
- ⁶⁶ KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. Desordens hemodinâmicas, trombose e choque. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. **Robins patologia básica**. Rio de Janeiro, RJ.: Saunders Elsevier, 2008. p. 87-114.
- ⁶⁷ PRP Wisconsin is your tendon connection. Disponível em: <http://www.tendonconnection.com/why_prp.html>. Acesso em: 19 fev.2011.
- ⁶⁸ AJJAN,R.; GRANT, P.J. Coagulation and atherothrombotic disease. **Atherosclerosis**, v. 186, n. 2, p. 240-259, 2006.
- ⁶⁹ FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação.,anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**., v.34, p. 229-237, 2001.
- ⁷⁰ OLIVEIRA, M.R.A.A.Coagulação plasmática-coagulopatias. In: OLIVEIRA, M.R.A.A. **Hematologia básica: fisiopatologia e estudo laboratorial**. São Paulo, SP.: Americanan Med, 1998, p.171-177.
- ⁷¹ RIDDEL JUNIOR, J.P.; AOUIZERAT, B.E.; MIASKOWISK, C.; LILLICRAP, P. Theories of blood coagulation. **J. Pediatr. Oncol. Nurs.**, v. 24, p. 123-131, 2007.
- ⁷² RANG, P.H.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Hemostasia e trombose. In: RANG, P.H.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, RJ.: Elsevier, 2003, p. 359-376.
- ⁷³ HAMBLETON, J. Fármacos utilizados nos distúrbios da coagulação. In: KATZUNG, B.G. (Ed.). **Farmacologia básica & clinica**. Rio de Janeiro, RJ.: Guanabara Koogan, 2005. p. 455-468.
- ⁷⁴ BALK, S.D. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 68, n. 2, p. 271-275, 1971.
- ⁷⁵ MIRABET, V.; SOLVES, P.; MIÑANA, M.D. Human platelet lysate enhances the proliferative activity of cultured human fibroblast-like cells from different tissues. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 1-10, 2008.
- ⁷⁶ SCHALLMOSER, K.; BARTMANN, C.; ROHDE, E.; REINISCH, A.; KASHOFER, K.; STADELMEYER, E.; DREXLER, C.; LANZER, G.; LINKESCH, W.; STRUNK, D. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. **Transfusion**, v. 47, p. 1436-1446, 2007.
- ⁷⁷ ZIMMERMANN, R.; JAKUBIETZ, R.; JAKUBIETZ, M.; STRASSER,E.; SCHLEGEL,A.; WILTFANG, J.; ECKSTEIN,R. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. **Transfusion**, v. 41, p. 1217-1223, 2001.
- ⁷⁸ BIEBACK, K.; HECKER, A.; KOCAÖMER, A.; LANNERT, H.; SCHALLMOSER, K.; STRUNK, D.; KLÜTER, H. Human alternatives for fetal bovine serum for the expansion os mesenchymal stromal cell from bone marrow. **Stem Cells**, v. 27, p. 2331-2341, 2009.

-
- ⁷⁹ KURITA, M.; AIBA-KOJIMA, E.; SUGA, H.; MATSUMOTO, D.; SUGA, H.; INOUE, K.; ETO, H.; KATO, H.; AOI, N.; YOSHIMURA, K. Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. **Plast. Reconst .Surg.**, v. 22, n. 2, p. 438-448, 2008.
- ⁸⁰ DOUCET, C.; ERNOU, I.; ZHANG, Y.; LLENSE, J.R.; BEGOT, L.; HOLY, X.; LATAILLADE, J.J. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. **J. Cell. Physiol.**, v. 205, p. 228-236, 2005.
- ⁸¹ BLANDE, I.; BASSANEZE, V.; LAVINI-RAMOS, C.; FAE, C.K.; KALIL, J.; MIYAKAWA, A.A.; SCHETTERE, I.T.; KRIEGER, J.E. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. **Transfusion**, v. 49, n. 12, p. 2680-2685, 2009.
- ⁸² XIAO, S.; ZHY, S.; MA, B.; XIA, Z.F.; YANG, J.; WANG, G. A new system for cultivation of human keratinocytes on acellular dermal matrix substitute with the use of human fibroblast feeder layer. **Cells Tissues Organs**, v. 187, p. 123-130, 2008.
- ⁸³ WONG, T.; McGRATH, J.A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. **Br.J.Dermatol.**, v. 156, p. 1149-1155, 2007.
- ⁸⁴ ATILATO, k.; KUISMANEN, E.; MYLLYLA, R.; KISTALA, U.; ASKO-SELJAVAARA, S.; VAHERI, A. Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. **J.Cell.Biol.**, v. 94, n. 4, p. 497-505, 1982.
- ⁸⁵ AMIT, M.; MARGULETS, V.; SEGEV, H.; SHARIKI, K.; LAEVSKY, I.; COLEMAN, R.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Human feeder-layer for human embryonic stem cells. **Biol. Reprod**, v. 68, n. 6, p. 2150-2156, 2003.
- ⁸⁶ INOUE, H.; OSHIMA, H.; MATSUZAKI, K.; KUMAGAI, N. Application for regenerative medicine of epithelial cell culture-vistas of cultured epithelium. **Congenit. Anom.**, v. 46, p. 129-134, 2006
- ⁸⁷ SUN,T.; HIGHAM, M.; LAYTON, C.; HAYCOCK, J.; SHORT, R.; MACNEIL, S. Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use. **Wound. Repair. Regen**, v. 12, n. 6, p. 626-634, 2004
- ⁸⁸ MASS-SZABOWSKI, N.; SHIMOTOYODOME, A.; FUSENIG, N.E. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via Double paracrine mechanism. **J.Cell.Sci.**, v. 112, p. 1843-1853, 1999.
- ⁸⁹ WAELTI, E.R.; IANEBNIT, S.P.; RAST, H.P.; HUNZIKER, T.; LIMAT, A.; BRAATHEN, L.R.; WIESMANN, U. Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblasts feeder cells: production of large amounts of interleukin 6. **J.Invest.Drematol.**, v. 98, n. 5, p. 805-808, 1992.

-
- ⁹⁰ BARRECA, A.; DE LUCCA, M.; DEL MONTE, P.; BONDANZA, S.; DAMONTE, G.; CARIOLA, G.; DI MARCO, E.; GIORDANO, G.; CANCEDDA, R.; MINUTO, F. In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-growth factor. **J.Cell.Physiol.**, v. 151, n. 2, p. 262-268, 1992.
- ⁹¹ BARRADON, Y.; GREEN, H. Cell size as a determinant of clone-forming ability of human keratinocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, p. 5390-5394, 1985.
- ⁹² BARRANDON, Y. ; GREEN, R. Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 2302-2306, 1987
- ⁹³ GUERRA, L.; BANDANZA, S.; RASKQVIK, D. Transplantation of *in vitro* cultured epithelial grafts for vitiligo and piebaldism. In: GUPTA, S.; OLSON, J.M.; KANWAR, J.A.; O, J.P. (Ed.). **Surgical management of vitiligo**. Malden, MA.: Backwell, 2007. p. 180-190.
- ⁹⁴ KLINGBEIL, M.F.G. **Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primária de queratinócitos bucais humanos**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ⁹⁵ GOODWIN, C.J.; HOLT, S.J.; DOWNES, S.; MARSHALL, N.J. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. **J. Immunol. Methods.**, v.179, p. 95-103, 1995.
- ⁹⁶ RISS, T.L.; MORAVEC, R.A. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In: CELIS, J. E. **Cell Biology: a laboratory handbook**. San Diego, CA.: Elsevier, p. 25-32.
- ⁹⁷ WILSON, A.P. Cytotoxicity and viability assays. In: FRESHNEY, R.I. (Ed.) **.Animal cell culture: a practical approach**. Oxford, New York, NY.: Oxford University, 1992. p. 265-297.
- ⁹⁸ RANZATO, E.; PATRONE, M.; MAZZUCO, L.; BURLANDO, B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCat keratinocytes. **Br. J. Dermatol.**, v. 159, p. 537-545, 2008.
- ⁹⁹ HARVIMA, I.T.; LAPPALAINEN, K.; HIRVONEN, M-R.; MÄTTÖ, M.; KIVINEN, P.K.; HYTTINEN, M.; PELKONEN, J.; NAUKKARINEN, A.; Heparin modulates the growth and adherence and augments the growth-inhibitory action of TNF- α , on cultured human keratinocytes. **J. Cell. Biochem.**, v. 92, p. 372-386, 2004.
- ¹⁰⁰ FRESHNEY, R.I. **Animal cell culture; a practical approach**. Cap.1 (1-14), 2nd ed. Oxford University, 1994.
- ¹⁰¹ FORMANEK, M.; MILLESI, W.; WILLHEIM, M.; SCHEINER, O.; KORNFELH, J. Optimized growth medium for primary culture of human oral keratinocytes. **Int. J. Maxillofac. Surg.**, v. 25, p. 157-160, 1996.
- ¹⁰² YOSHITO, D. **Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisado de plaquetas para a obtenção de camada de sustentação em cultura de células da epiderme**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.