

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DAS BOLSAS DE GORDURA DA PÁLPEBRA EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM PLASMA

Edlêla Sabino Silva^{1,2}, Amanda Rosa dos Santos¹, Sofia Lopes Isenmann¹, Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat³, Yanna Cristina Reis Monteiro⁴, Thaís Maria da Mata Martins¹.

¹ Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil

² Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

³ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil

⁴ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Resumo: Para futura utilização das células-tronco das bolsas de gordura palpebral (OFSCs) na medicina regenerativa é essencial estabelecer condições de cultivo livres de componentes xenogênicos. O uso do soro fetal bovino (SFB) como suplemento do meio de cultivo é um dos obstáculos para a aplicação clínica das células-tronco devido aos riscos de transmissão de patógenos e de indução da resposta imunológica inerentes ao uso de derivados de origem xenogênica. Este estudo teve como objetivo central avaliar a capacidade de proliferação das OFSCs cultivadas em meio de cultura suplementado com plasma alogênico humano em substituição ao SFB. Os resultados demonstraram que houve maior cinética de proliferação celular na presença do meio de cultura suplementado com plasma, indicando a viabilidade do uso desse suplemento para cultivo de células para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Células tronco; bolsas de gordura da pálpebra; plasma; soro fetal bovino.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais, também denominadas células estromais mesenquimais ou células sinalizadoras medicinais (MSCs, do inglês *mesenchymal stem/stromal/medicinal signaling cells*), são células adultas multipotentes capazes de se diferenciar predominantemente em linhagens mesodérmicas, além de exercerem funções imunomoduladoras e parácrinas essenciais (Caplan AI., 2017; Pittenger MF et al., 1999; HUANG, Yutong; WU, Qiang; TAM, Paul Kwong Hang., 2022). As MSCs apresentam grande potencial para aplicações em medicina regenerativa, pois, além da capacidade de diferenciação e propriedades imunomoduladoras, possuem capacidade de proliferação e autorrenovação (Law e Chaudhuri, 2013). Ademais, podem ser utilizadas em terapias celulares e transplantes autólogos ou alogênicos devido à sua baixa imunogenicidade (Le Blanc K & Ringdén O., 2007).

As MSCs foram, inicialmente, isoladas da medula óssea. Posteriormente, células com características semelhantes às MSCs foram identificadas em diversos tecidos, como tecido adiposo de diferentes depósitos anatómicos, cordão umbilical e polpa dentária (Zuk et al., 2001; Gronthos et al., 2000; Secco et al., 2008).

Korn et al. (2009) descreveram, pela primeira vez, o isolamento e a caracterização de células-tronco derivadas das bolsas de gordura palpebral humana (OFSCs – orbital fat-derived stem cells). As bolsas de gordura da pálpebra representam uma fonte promissora de MSCs, pois são frequentemente descartadas em procedimentos de blefaroplastia, permitindo a obtenção de células de forma acessível e minimamente invasiva (Ho et al., 2011).

Apesar dos avanços recentes nas pesquisas envolvendo medicina regenerativa, um dos principais desafios para a aplicação clínica das MSCs é o estabelecimento de métodos de expansão celular eficazes, seguros e compatíveis com os protocolos de Boas Práticas de Fabricação (GMP – Good Manufacturing Practices) (Yong et al., 2015). Tradicionalmente, o soro fetal bovino (SFB) é utilizado como suplemento nos meios de cultura devido à sua alta concentração de fatores de crescimento e proteínas essenciais para a manutenção celular (Marquez-Curtis et al., 2015; Yong et al., 2015). Entretanto, o uso do SFB apresenta limitações importantes, como variabilidade entre lotes, risco potencial de transmissão de patógenos, presença de endotoxinas e exposição das células a proteínas xenogênicas capazes de desencadear respostas imunológicas indesejáveis (Spees et al., 2004;



Heiskanen et al., 2007; Mannello e Tonti, 2007; Paula et al., 2013; Van der Valk et al., 2018).

Diante disso, a substituição do SFB por suplementos livres de componentes xenogênicos tornou-se uma estratégia central para o desenvolvimento de sistemas de cultura mais seguros e adequados ao uso terapêutico. Entre as alternativas investigadas destacam-se os hemoderivados humanos como soro autólogo ou alogênico, o plasma, o plasma rico em plaquetas, o lisado plaquetário humano, além de meios quimicamente definidos livres de soro (Lin et al., 2005; Kocaoemer et al., 2007; Bieback et al., 2009; Burnouf et al., 2016; Guiotto et al., 2020).

A efetividade da suplementação com soro humano sobre o SFB para o cultivo de OFSCs foi reportado anteriormente na literatura (Martins et al., 2014). Entretanto, a utilização de plasma humano ainda não foi investigada para o cultivo das OFSCs. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar a capacidade proliferativa das OFSCs cultivadas em meio suplementado com plasma humano ou SFB, avaliando o potencial do plasma como alternativa para a expansão celular destinada a aplicações terapêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do plasma humano alogênico

Bolsas de plasma humano foram fornecidas pela Fundação Hemominas, conforme protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 02887512.6.0000.5149). O plasma proveniente de sangue total coletado em anticoagulante CPDA-1 (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio e dextrose) foi distribuído em tubos cônicos de polietileno com capacidade para 50 mL. Em seguida, adicionou-se solução de CaCl_2 0,025 M, e os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos para separação da rede de fibrina formada. O sobrenadante obtido foi então coletado, submetido à inativação térmica a 56 °C por 30 minutos e armazenado a -20 °C até sua utilização.

Meios de cultura celular

As culturas celulares foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B além de 60 mg/L de gentamicina.

Dois tipos de meios basais foram empregados:

(i) meio basal acrescido de 10% de SFB (SFB);

(ii) meio basal suplementado com 10% de plasma humano.

Posteriormente, o pH dos meios foi ajustado para 7,2, seguido de filtração em membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm.

Isolamento e cultivo das OFSCs

O tecido adiposo foi obtido das bolsas de gordura da pálpebra superior removidas durante blefaroplastia de cinco pacientes saudáveis, com idade entre 51 e 68 anos, internados na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 02887512.6.0000.5149). Em capela de fluxo laminar, o tecido adiposo foi lavado em tampão fosfato salino 0,15M, pH 7,2 (PBS), picotado e tratado com solução de collagenase tipo I 0,10% em PBS, por 1 hora, em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO_2 , para digestão da matriz extracelular. Após centrifugação a 1400 rpm por 10 minutos, os precipitados contendo as frações celulares resultantes do processamento enzimático das bolsas de gordura foram ressuspensos em meio de cultura basal e transferidos para garrafas de cultura celular T-25 que foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO_2 . A cada dois dias de cultivo, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes. Quando as células atingiram confluência, elas foram tratadas com tripsina 0,05% EDTA por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular.

Tempo de duplicação da população

Para este ensaio, as células foram monitoradas desde o isolamento inicial. Em cada passagem celular, foram semeadas 1×10^5 células em garrafas de cultura T25 contendo os dois diferentes meios basais, suplementados com 10% de SFB ou 10% de plasma humano. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 , até atingirem confluência. Ao alcançarem confluência, as células foram quantificadas. Inicialmente, as culturas foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M (pH 7,2) e, posteriormente, destacadas das garrafas T25 utilizando solução de tripsina-EDTA a 0,05% durante 5 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio basal para determinação do número celular em hemocítômetro (HBG). O tempo de duplicação celular nos diferentes meios de cultura foi calculado por meio da seguinte equação:

$$y = (T2 - T1) \times \log_{10} 2 \div \log_{10}(N2 \div N1),$$

na qual,



y: tempo de duplicação;

T2: horário de contagem das células;

T1: horário de plaqueamento das células;

N2: número de células contadas ao alcançarem confluência;

N1: número de células plaqueadas.

Curva de crescimento

As curvas de crescimento das OFSCs mantidas nos dois meios de cultura basal distintos, suplementados com 10% de SFB ou 10% de plasma humano, foram estabelecidas a partir da quantificação celular em intervalos de tempo previamente determinados. Para isso, no tempo inicial, 5×10^3 células, na quarta passagem, foram semeadas em garrafas de cultura celular T25 e mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células permaneceram em cultivo pelos períodos de 3, 5, 7, 9 e 11 dias. Ao término de cada intervalo experimental, foi realizada a contagem celular conforme o procedimento anteriormente descrito.

Viabilidade celular

A viabilidade das OFSCs foi avaliada por meio do ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], um método colorimétrico baseado na capacidade das enzimas desidrogenases presentes em células viáveis de reduzir o sal de MTT, solúvel em água, formando cristais de formazan insolúveis (Mosmann, 1983). Após solubilização dos cristais formados, a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm. As OFSCs cultivadas nos dois meios basais distintos, suplementados com SFB ou plasma humano, foram utilizadas na quarta passagem. As células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^2 células/poço, contendo 1 mL do respectivo meio de cultura, e incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, pelos períodos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Ao final de cada período experimental, o meio de cultura foi removido e substituído por 210 µL/poço do respectivo meio basal. Em seguida, adicionaram-se 170 µL/poço da solução de MTT (5 mg/ml) e as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 2 horas. Posteriormente, as culturas foram analisadas em microscópio de luz para observação e registro fotográfico dos cristais de formazan. A solubilização dos cristais foi realizada mediante adição de 210 µL/poço de solução SDS 10%-HCl (ácido clorídrico 0,01 M contendo 10% de dodecil sulfato de sódio em água), seguida de incubação por 18 horas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, alíquotas de 100 µL de cada poço foram transferidas, em triplicata, para placas de 96 poços de fundo reto, e a densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro a 595 nm. Durante

todo o procedimento experimental, as etapas envolvendo o reagente MTT foram conduzidas sob condições de baixa luminosidade.

Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, adotando-se esquema fatorial para os tratamentos avaliados. Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variâncias utilizando o programa Sisvar. Em seguida, realizou-se análise de variância (ANOVA) para avaliação dos resultados. As variáveis com distribuição paramétrica, bem como aquelas normalizadas após transformações logarítmica ou quadrática, foram analisadas por meio do teste t ou do teste SNK, conforme o tipo de comparação efetuada. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$), utilizando-se o software estatístico R para as análises. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia celular e tempo de duplicação

Por décadas, o SFB tem sido amplamente adotado para a expansão de MSCs em cultivos in vitro. No entanto, sua utilização passou a ser progressivamente questionada em razão dos riscos associados à imunogenicidade, à possível transmissão de patógenos de origem xenogênica e às restrições regulatórias impostas à produção de terapias celulares destinadas ao uso clínico em humanos. Nesse contexto, a busca por suplementos alternativos de origem humana ganhou relevância não apenas para a etapa de expansão celular, mas também para os processos de diferenciação. A eliminação de componentes xenobióticos dos meios de cultura é preconizada pelos protocolos de Boas Práticas de Manipulação como requisito fundamental para a utilização terapêutica segura das células-tronco (Lindroos et al., 2011). Diante desse cenário, o presente estudo avaliou o plasma humano como substituto ao SFB no cultivo das OFSCs, investigando seu impacto sobre a viabilidade e a cinética de proliferação dessas células.

Estudos recentes demonstram que derivados sanguíneos humanos podem favorecer a proliferação e manter características fenotípicas e funcionais das MSCs. Salkin et al. (2023) observaram aumento significativo da proliferação e viabilidade, além de redução da apoptose e da senescência em MSCs derivadas de tecido adiposo humano cultivadas com plasma rico em plaquetas. De forma semelhante, Ebrahim et al. (2021) relataram que a associação entre plasma rico em plaquetas humano e MSCs derivadas de tecido adiposo da parede abdominal de ratos ocasionou a aceleração do processo de cicatrização em feridas diabéticas. Além disso, Marino et al. (2023)

evidenciaram que MSCs derivadas do cordão umbilical humano quando cultivadas em meio suplementado com lisado plaquetário humano liofilizado apresentaram proliferação celular aprimorada e capacidade de diferenciação superior quando comparadas com as células cultivadas em meio contendo SFB fortificado com ferro.

A análise morfológica das OFSCs cultivadas nas diferentes condições experimentais revelou que, em todas as situações, as células mantiveram morfologia fusiforme e aderência à superfície plástica, características morfológicas típicas de MSCs em cultivo *in vitro*. Contudo, diferenças morfológicas relevantes foram identificadas entre os grupos: as OFSCs cultivadas na presença de plasma humano apresentaram tamanho reduzido e maior densidade celular em comparação às células mantidas em meio suplementado com SFB (Figura 1).

Esse perfil morfológico é biologicamente significativo, pois células de menor tamanho e maior densidade tendem a refletir um estado proliferativo mais ativo e um menor grau de senescência celular. Essa interpretação é corroborada pela literatura, uma vez que MSCs em processo de senescência tipicamente exibem morfologia aumentada e achatada - padrão inversamente oposto ao observado nas OFSCs cultivadas em plasma humano -, sugerindo que esse suplemento de origem humana contribui para a preservação de um estado celular mais jovem e funcionalmente íntegro ao longo da expansão *in vitro*. Esse achado condiz com observações previamente relatadas na literatura: células-tronco derivadas do tecido adiposo obtidas a partir de lipoaspirado cultivadas em meio suplementado com pool de soro alogênico humano, soro humano AB ou plasma rico em plaquetas ativado com trombina também apresentaram tamanho celular reduzido em comparação às células mantidas em meio suplementado com SFB (Kocaoemer et al., 2007; Paula et al., 2013, Paula et al., 2015). De forma complementar, Isaac et al. (2011) demonstraram que fibroblastos cultivados em meio contendo soro humano exibiam dimensões celulares menores do que aqueles mantidos em meio suplementado com SFB, reforçando a noção de que suplementos de origem humana consistentemente favorecem a manutenção de um fenótipo celular mais compacto e proliferativamente ativo em diferentes tipos celulares de origem mesenquimal.

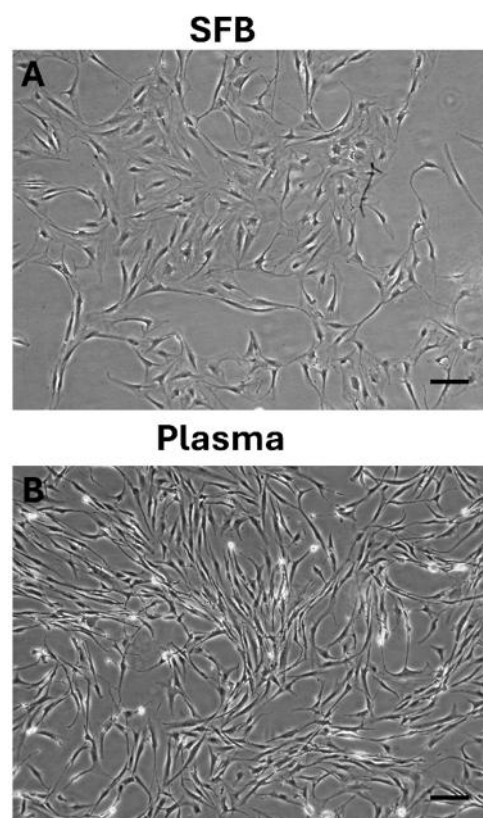


Figura 1. Aspectos morfológicos das OFSCs, na segunda passagem, durante a determinação do tempo de duplicação da população em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou plasma humano. O mesmo número inicial de células foi plaqueado em ambas as condições. Barra = 150 µm.

O tempo de duplicação médio das OFSCs cultivadas em meio de cultura suplementado com plasma foi de 70 horas, enquanto nas culturas mantidas em meio contendo SFB o tempo de duplicação médio estimado foi de 89 horas. Esses resultados corroboram dados previamente descritos na literatura, nos quais derivados sanguíneos humanos promovem menor tempo de duplicação celular e maior número de duplicações populacionais quando comparados ao SFB (Martins et al., 2014; Cañas-Arboleda et al., 2020; Blázquez-Prunera et al., 2017; Paula et al., 2015).

A maior capacidade proliferativa observada nas culturas celulares suplementadas com plasma pode estar relacionado à presença de fatores de crescimento e moléculas bioativas humanas, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF - platelet-derived growth factor), fator de crescimento transformador (TGF- α - transforming growth factor alpha) e fator de crescimento epidérmico (EGF - epidermal growth factor) dentre outros, capazes de estimular proliferação, sobrevivência e metabolismo das MSCs (Cañas-Arboleda et al., 2020).

Curva de Crescimento

As curvas de crescimento das OFSCs cultivadas nos dois diferentes meios de cultura basal foram obtidas plaqueando o mesmo número inicial de células (dia 0). As células foram contadas aos 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo (Figura 2).

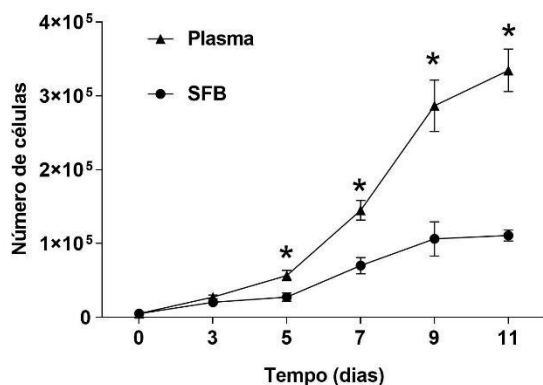


Figura 2. Curva de crescimento das OFSCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB ou plasma humano. No tempo zero, 5×10^3 células, na 4ª passagem, foram plaqueadas em garrafas de cultura celular T25. Após 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo foi feita a contagem do número de células. $n=3$. * Meio suplementado com plasma *versus* meio suplementado com SFB ($p<0,05$).

A cinética de proliferação das OFSCs, demonstrada pelas curvas de crescimento, revelou um padrão diferencial entre os meios suplementados com plasma humano ou SFB. A partir do 5º dia de cultivo, as células mantidas em plasma humano exibiram aceleração progressiva do crescimento, comportamento que não foi observado nas OFSCs cultivadas em SFB. De forma ainda mais expressiva, a partir do 9º dia, as células cultivadas em SFB tenderam à estagnação proliferativa, sem acúmulo numérico significativo, ao passo que aquelas mantidas em plasma humano continuaram a proliferação de maneira consistente até o 11º dia, último ponto avaliado. Esse padrão indica que o SFB não apenas sustenta uma cinética de crescimento mais lenta, mas também, parece impor uma limitação proliferativa precoce que não foi observada nas células cultivadas com plasma humano. Em outros estudos, resultados semelhantes foram descritos ao se comparar hemoderivados humanos ao SFB ou a seus substitutos convencionais. Marino et al. (2023), ao avaliarem o lisado plaquetário humano frente ao SFB enriquecido com ferro no cultivo de MSCs derivadas do cordão umbilical humano, verificaram que células mantidas em meio com apenas 5% de lisado plaquetário humano apresentaram contagem celular significativamente superior em todas as passagens avaliadas (P0 a P3), em comparação àquelas cultivadas com 10% de SFB enriquecido com ferro.

Esse achado é particularmente relevante por demonstrar que o hemoderivado humano, mesmo empregado em concentração duas vezes inferior à do suplemento convencional, superou seu desempenho proliferativo (Marino et al. (2023). Embora o referido estudo tenha utilizado lisado plaquetário em vez de plasma humano convencional, os dados reforçam o potencial dos hemoderivados humanos em ampliar a capacidade proliferativa das MSCs.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo, associados aos dados de tempo de duplicação e crescimento acumulado, indicam que o plasma humano favorece a expansão *ex vivo* das OFSCs de maneira mais eficiente do que o SFB.

Viabilidade celular

A viabilidade e a atividade metabólica das OFSCs foram investigadas por meio do ensaio de MTT, no qual a conversão do sal tetrazólio em cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais reflete, indiretamente, o grau de atividade e proliferação celular. Os cristais formados foram solubilizados e a densidade óptica mensurada espectrofotometricamente como critério quantitativo de comparação entre os meios suplementados com plasma humano e SFB. No sétimo dia de cultivo, os dois suplementos produziram respostas metabólicas equivalentes, sem diferença entre si, indicando que, na fase inicial do cultivo há uma adaptação. À medida que o cultivo avançou, contudo, esse cenário se modificou de forma expressiva: nos dias 14, 21 e 28 as células mantidas em meio suplementado com plasma exibiram metabolização do MTT significativamente superior àquelas cultivadas na presença de SFB ($p < 0,05$). Esses dados podem refletir não apenas um maior número de células viáveis, mas também maior atividade metabólica das OFSCs em meio suplementado com plasma. Quando associados aos dados de curva de crescimento e tempo de duplicação celular, esses achados sugerem maior atividade proliferativa das OFSCs na presença do plasma.

Esse conjunto de evidências posiciona o plasma humano como um suplemento biologicamente mais eficaz do que o SFB para a expansão das OFSCs *in vitro*, em consonância com achados recentes que relatam maior proliferação e expansão celular na presença de derivados sanguíneos humanos em comparação a suplementos de origem xenogênica (Paula et al., 2013; Martins et al., 2014; Paula et al.,

2015; Marino et al., 2023; Kirsch et al., 2021; Blázquez-Prunera et al., 2017).

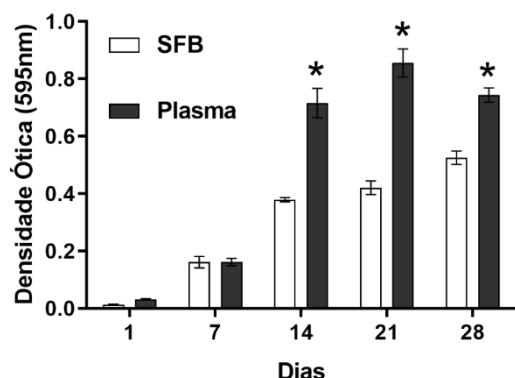


Figura 3. Representação gráfica da metabolização do MTT pelas OFSCs cultivadas em meios de cultura suplementado com SFB ou plasma humano. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de MTT, os cristais de formazan formados foram solubilizados e a densidade ótica mensurada. $n = 3$; * meio suplementado com plasma *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o plasma humano alogênico foi capaz de sustentar o cultivo e a expansão *ex vivo* das OFSCs, mantendo características morfológicas compatíveis com MSCs, como morfologia fusiforme e aderência à superfície plástica. Além disso, as células cultivadas em meio suplementado com plasma apresentaram maior densidade celular e menor tempo médio de duplicação quando comparadas às cultivadas em meio contendo SFB.

As análises de curva de crescimento evidenciaram maior capacidade proliferativa das OFSCs cultivadas em plasma humano, especialmente nos períodos mais prolongados de cultivo, enquanto as células mantidas em SFB apresentaram tendência à estabilização proliferativa. De maneira semelhante, os resultados do ensaio de MTT indicaram maior atividade metabólica, proliferação e viabilidade celular nas OFSCs cultivadas em meio suplementado com plasma humano em comparação ao SFB. Em conjunto, esses achados indicam que o plasma humano constitui uma alternativa biologicamente viável ao SFB para a expansão *in vitro* das OFSCs, favorecendo sua viabilidade e capacidade proliferativa ao longo do cultivo.

REFERÊNCIAS

BIEBACK, K.; HECKER, A.; KOCAÖMER, A. et al. Bovine serum for the expansion of mesenchymal

stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, v. 27, p. 2331-2341, 2009.

BLÁZQUEZ-PRUNERA, Arantxa et al. Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction. *Stem cell research & therapy*, v. 8, n. 1, p. 103, 2017.

BURNOUF, Thierry et al. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?. *Biomaterials*, v. 76, p. 371-387, 2016.

CAÑAS-ARBOLEDA, Mariana et al. Human platelet lysate supports efficient expansion and stability of wharton's jelly mesenchymal stromal cells via active uptake and release of soluble regenerative factors. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 6284, 2020.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*, v. 6, n. 6, p. 1445-1451, 2017.

CHO, H. S.; SONG, I. H.; PARK, S. et al. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, v. 31, p. 212-218, 2011.

EBRAHIM, Nesrine et al. Adipose mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma accelerate diabetic wound healing by modulating the Notch pathway. *Stem cell research & therapy*, v. 12, n. 1, p. 392, 2021.

GOTTIPAMULA, S; MUTTIGI, M. S.; CHAANSA, S. et al. Large-scale expansion of pre isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Journal of tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2013.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. In: *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

GUIOTTO, M. et al. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *Journal of translational medicine*, v. 18, n. 1, p. 351, 2020.

HEISKANEN, A.; SATOMAA, T.; TIITINEN, S. et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*, v. 25, p. 197-202, 2007.

ISAAC, C.; DE MATTOS, C. N.; RÊGO, F. M. P. et al. Substituição de soro bovino fetal por soro



- humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 26, n. 3, p. 379-384, 2011.
- HO, J. H. C.; MA, W. H.; TSENG, T. C.; et al. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Engineering*, v. 17, n. 1, p. 255-266, 2011.
- HUANG, Yutong; WU, Qiang; TAM, Paul Kwong Hang. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their potential clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 17, p. 10023, 2022.
- HUDSON, J. E.; MILLS, R. J.; FRITH, J. E. et al. Defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells and Development*, v. 20, n. 1, 2011.
- KIRSCH, Marline et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 8, p. 598389, 2021.
- KOCADOEMER, A.; KERN, S.; KLÜTER, H. et al. Serum and thrombin-activated platelet rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*, v. 25, p. 1270-1278, 2007.
- KORN, B. S.; KIKKAWA, D. O.; HICOK, K. C. Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, v. 25, n. 1, p. 27-32, 2009.
- LAW, S.; CHAUDHURI, S. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges: a review. *American Journal of Stem Cells*, v. 2, n. 1. p. 22-38, 2013.
- LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine*, v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.
- LIN, H. T.; TARNG, Y. W.; CHEN, Y. C. et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple lineage potential. *Transplantation Proceedings*, v. 37, p. 4504-4505, 2005.
- LINDROOS, B.; AHO, K.; KUOKKANEN, H. et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Engineering: Part A*, v. 16, p. 2281-2294, 2010.
- LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, v. 7, p. 269-291, 2011.
- MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise Review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal 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, p. 1603-1609, 2007.
- MARINO, Lincy Shiny; NITHYA, Thirumullaivoyal Gnanasekaran; JULIUS, Angeline. Lyophilized human platelet lysate as a supplementation in the culture of umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*, v. 82, p. 102092, 2023.
- Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015;71(2):181-197.
- MARTINS, et al. Alkaline phosphatase expression/activity and multilineage differentiation potential are the differences between fibroblasts and orbital fat-derived stem cells—a study in animal serum-free culture conditions. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 10, n. 5, p. 697-711, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- PAULA, A. C. C.; ZONARI, A. A. C.; MARTINS, T. M. M. et al. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. *Tissue Engineering: Part A*, v. 19, n. 1-2, p. 277-289, 2013.
- PAULA, Ana CC et al. Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. *Stem cell research & therapy*, v. 6, n. 1, p. 76, 2015.
- PÉREZ-ILZARBE, M.; DÍEZ-CAMPELO, M.; ARANDA, P. et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion*, v. 49, p. 1901-1910, 2009.
- PITTENGER, Mark F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.



SALKIN, Hasan. Inactive Platelet Rich Plasma in Culture Conditions Increases the Proliferation and Decreases the Apoptosis and Senescence of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. Cyprus Journal of Medical Sciences, 2023.

SECCO, M.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! Stem Cells, v. 26, p. 146-150, 2008.

SPEES, J. L.; GREGORY, C. A.; SINGH, H. et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Molecular Therapy, v. 9, p. 447-456, 2004.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. Toxicology in Vitro, v. 24, p. 1053-1063, 2010.

WAGNER, Wolfgang et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. PloS one, v. 3, n. 5, p. e2213, 2008.

Yong KW, Safwani WKZW, Xu F, Wan Abas WAB, Choi JR, Pingguan-Murphy B. Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications: Current Methods and Challenges. Stem Cells International. 2015;2015:1–14.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Engineering, v. 7, p. 211-228, 2001.