



**Isolamento de células mesenquimais estromais oriundas do corpo adiposo bucal (Bola de Bichat) de humanos**

**Isolation of mesenchymal stromal cells from human Bichat's fat pad**

**Orientador:** Marcelo Rocha Marques

**Aluna:** Beatriz Fantoni

**Piracicaba  
2020**

## **1. Objetivos**

O uso de células mesenquimais estromais (MSCs) adultas autólogas como terapia para doenças têm sido comprovado em ensaios clínicos. O tecido adiposo tem se tornado uma fonte atraente de MSCs devido a facilidade ao acesso e a rica vascularização.

Os objetivos da pesquisa foram:

- Estabelecer protocolos laboratoriais para o isolamento de ASCs oriundas de BFP.
- Caracterizar estas células quanto ao seu potencial de multipotencialidade, induzindo-as à diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica.

## **2. Materiais e Métodos**

A pesquisa foi realizada no Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (CAAE 02777918.0.0000.5418).

### **2.1 Seleção das amostras**

As amostras foram coletadas de 3 pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico estético, no qual haveria remoção e descarte do corpo adiposo bucal. Previamente ao procedimento, o paciente recebeu todas as informações verbalmente e por escrito, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) sobre a pesquisa. O tecido que seria descartado, foi coletado em frascos estéreis, etiquetados com código numérico, com sexo e idade do paciente e imediatamente levado para a Cultura de Células para processamento.

### **2.2 Processamento da amostra: Isolamento sem digestão enzimática**

Após a coleta realizou-se limpeza da amostra com solução salina de Hank (HBSS) com 0,75% ATB e 0,5%ATF. Com tesouras e pinças estéreis essa amostra foi cortada em fragmentos pequenos dispostos espaçados em placa de cultura. Foi adicionado meio de cultura DMEM suplementado (20% FBS, 3%ATB, 1% ATF, 1:500 mycozap e 1:500 Glutamax) de maneira que não deixasse os fragmentos flutuarem, deixando uma parte do fragmento em contato direto com a placa, e foram mantidas em estufa a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

No momento em que os fragmentos estavam completamente envoltos por células, foram removidos, descartados, e foi realizada uma lavagem com HBSS, e as células continuaram a ser cultivadas até chegar a uma confluência de 70%.

Após parte das células foram congeladas e outra parte foram cultivadas até a cultura na passagem 3.

### **2.3 Ensaios de diferenciação in vitro**

Para demonstrar a plasticidade das ASCs, estas foram estimuladas a diferenciar-se em células das linhagens osteogênicas e adipogênicas.

Foram descongeladas e plaqueadas as células isoladas do isolamento não enzimático, de três pacientes. A indução da diferenciação em diferentes linhagens foi realizada quando as culturas atingiram ~70% de confluência. As células foram contadas, e foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células (diferenciação osteogênica), e  $2 \times 10^4$  células (adipogênica), em uma placa de 24 poços para cada paciente.

Foram utilizados meios de indução específicos para cada linhagem: osteogênica (DMEM, 10% de hPL, 100 nM dexametasona, 10 mM  $\beta$ glicerofosfato e 50  $\mu$ g/ml ácido ascórbico) e adipogênica (DMEM, 10%hPL, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethasone and 5  $\mu$ g/ml insulín-transferrin-selenium-X).

O meio base sem os suplementos foi utilizado como controle negativo. Ao final de cada período de cada diferenciação (depois de 21 dias), a caracterização das células se deu pela fixação e colorações específicas.

### **2.4 Análise de Marcadores de superfície por citometria de fluxo**

Células durante a terceira passagem do isolamento não enzimático foram analisadas por meio de citometria de fluxo para marcadores de caracterização de células-tronco mesenquimais. CD34 FITC, CD90 APC, CD105 APC, CD146 AF488, CD34 PerCP Cy5.5 e HILA-DR FITC).

O número de células para este ensaio foi de  $3,5 \times 10^5$  por amostra.

## **3. Resultado**

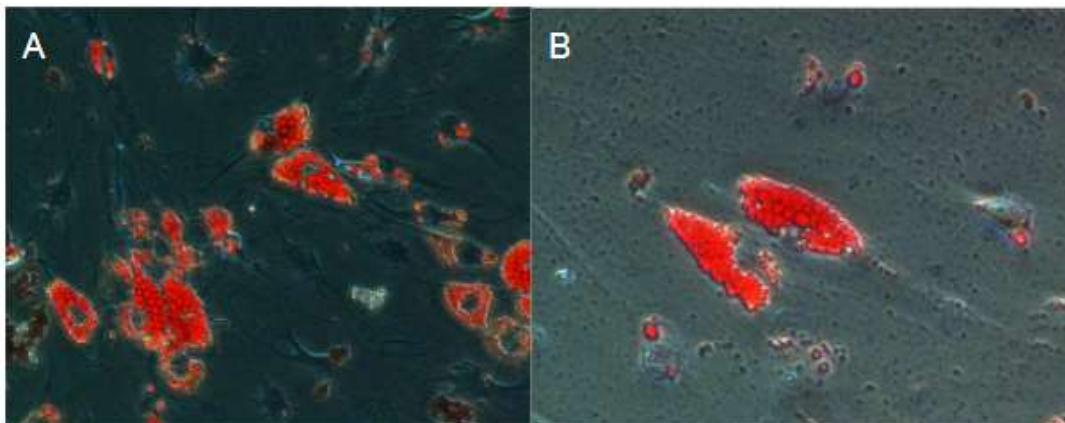
### **3.1 Ensaios de diferenciação in vitro**

Foram realizados dois tipos de diferenciação nas células mesenquimais estromais derivadas da Bola de Bichat, a diferenciação adipogênica e a diferenciação osteogênica. As células de 3 diferentes pacientes foram induzidas para a diferenciação através dos protocolos. As células dos 3 pacientes utilizadas responderam positivamente as diferenciações.

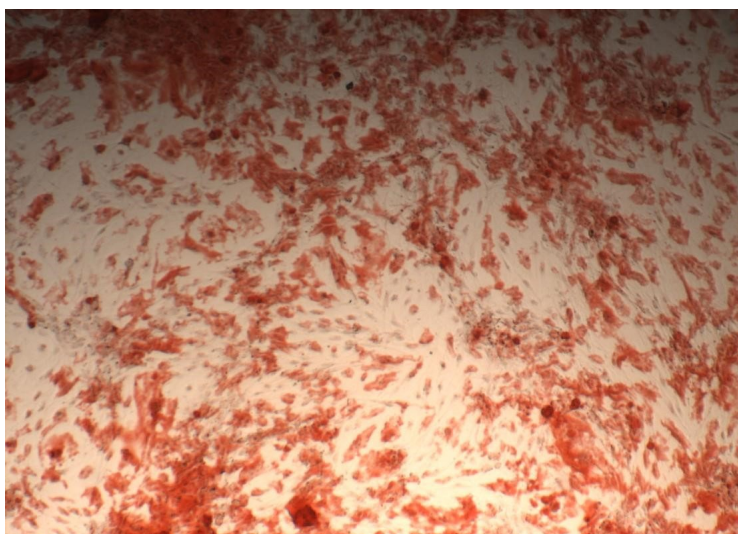
Na linhagem adipogênica, mesmo sendo possível observar as gotículas lipídicas no momento da coloração, os resultados das fotografias microscópicas não foram satisfatórios, pois como demorou alguns dias para realizá-las, o corante já estava fora do citoplasma célula. Na segunda tentativa, foi fotografado assim que terminado o processo de coloração, sendo possível

observar as gotículas lipídicas coradas bem mais delimitadas e no interior da célula (Figura 1).

Na linhagem osteogênica, foi possível observar a mineralização da matriz óssea, onde os depósitos de cálcio foram corados por Alizarina Red S 2% (Figura 2).



**Figura 1.** Nas figuras A (200x) e B (400x) é possível observar as gotículas lipídicas coradas com Oil Red no interior das células cultivadas em cultura com meio adipogênico.



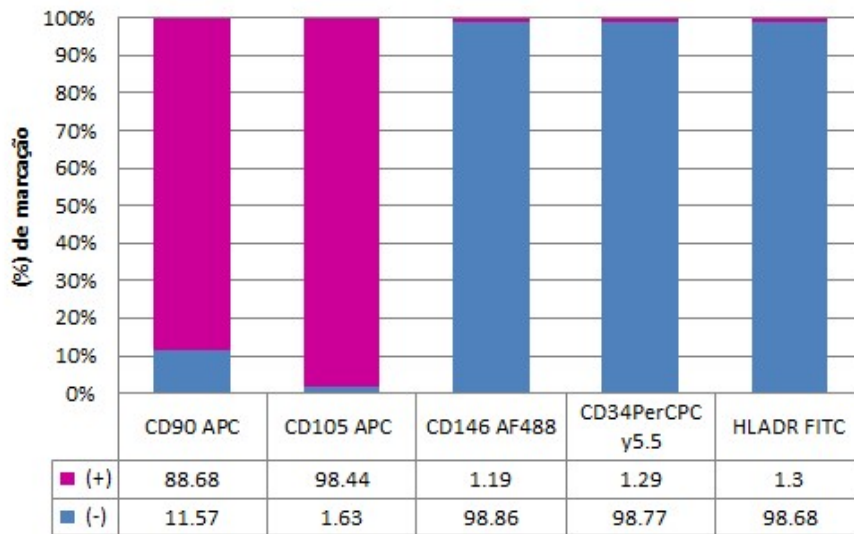
**Figura 2.** Deposição de cálcio corada com vermelho de alizarina nas células cultivadas em cultura com meio osteogênico.

### 3.2 Citometria de Fluxo

A análise de marcadores de superfície característicos de MSCs (positivos e negativos) foi representada como porcentagem de reatividade de células de cada paciente para cada anticorpo testado (Figura 3).

A imunofenotipagem evidenciou que os marcadores positivos CD90 e CD105 apresentaram respectivamente marcação de 88,68% e 98,44% em relação ao

total de células marcadas. Os marcadores negativos CD146, CD34 e HLA-DR apresentaram marcação de 1,19%, 1,29% e 1,3% respectivamente.



**Figura 3.** Representação da porcentagem celular após marcação com os anticorpos CD90 APC, CD105 APC, CD 146 AF488, CD34 PerCP Cy5.5 e HLA-DR FITC.

#### 4. Conclusão

O isolamento de células mesenquimais de corpo adiposo bucal através de um protocolo não enzimático se mostrou eficaz quanto a proliferação, e também quanto a caracterização dessas células. Apresentou-se como um protocolo reprodutível, sendo de interesse para pesquisas futuras.