

do Amaral, M.V. F.<sup>1,2</sup>; Porto, M.<sup>2</sup>; Franke, C.<sup>3</sup>; Diesel, L.F. da C.<sup>2</sup>; Sassi, A.<sup>3</sup>; da Costa, L.A.L.<sup>3</sup>; Chem, E.<sup>3</sup>; Nardi, N.B.<sup>2</sup>; Camassola, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Medicina da ULBRA, bolsista PROICT-ULBRA

<sup>2</sup> Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos da ULBRA

<sup>3</sup> Serviço de Cirurgia Plástica da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

E-mail para contato: mariavoritoria.301@gmail.com



## INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell* - MSCs) são as células-tronco adultas com plasticidade e elas diferenciam-se em células osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. As MSCs que provêm do tecido adiposo denominam-se ASCs (*adipose-derived stem cells*) e elas têm sido utilizadas no reparo de lesões, contudo, em algumas situações é preciso cultivá-las *in vitro*, o que pode acarretar modificações celulares indesejadas. Objetivo: caracterizar as ASCs cultivadas em passagens iniciais (1 a 9 passagens), intermediárias (10 a 19 passagens) e avançadas (20 a 35 passagens).

## METODOLOGIA

As ASCs foram isoladas de lipoaspirado proveniente de pacientes do Serviço de Cirurgia Plástica da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e cultivadas a longo prazo. As células foram caracterizadas em cada período de cultivo de acordo quanto a sua imunofenotipagem, plasticidade e potencial clonogênico. A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo e foram coletados mais de 10.000 eventos. A diferenciação celular foi induzida por incubação com o meio de cultura específico para indução osteo, condro e adipogênica. A determinação do potencial clonogênico foi realizada em culturas em triplicata após o cultivo das células pelo método de diluição limitante.

## RESULTADOS

As amostras foram coletadas de lipoaspirados provenientes do braço, glúteo, flancos e abdômen de homens e mulheres, e o rendimento celular variou de 2 a 10 x 10<sup>5</sup> por mL de lipoaspirado. A taxa de expansão celular mostrou-se conforme a figura 1a, já a clonogenicidade, conforme a figura 1b. A morfologia celular foi mantida em todos os períodos e a aderência das ASCs aumentou de acordo com o número de passagens. A expressão dos marcadores de superfície (figura 2) seguiu o perfil esperado para células-tronco mesenquimais e o tempo de cultivo não alterou essa expressão. Também houve diferenciação das ASCs (figura 3) nas três linhagens celulares em todas as passagens, mas a adipogênica foi a que apresentou maior capacidade de diferenciação. Entretanto foi observada uma diminuição progressiva do potencial de diferenciação ao longo das passagens.

## CONCLUSÃO

Comparando-se os resultados obtidos com estudos realizados com MSCs de medula-óssea, verificou-se que estas apresentaram alterações na morfologia celular e redução na taxa de expansão de modo progressivo diferentemente do que ocorreu com as ASCs. Além disso, as ASCs apresentam maior abundância (100 a 500 vezes mais) por mL de tecido, maior facilidade de obtenção e menor morbidade para o doador. Desta forma, a utilização para fins terapêuticos dessas células é mais vantajosa, contudo, é interessante que elas sejam submetidas a culturas iniciais e intermediárias devido à redução na capacidade de diferenciação celular, clonogenicidade e proliferação em culturas em passagens avançadas.

## APOIO

CNPq, FAPERGS, ULBRA e ISCMPA

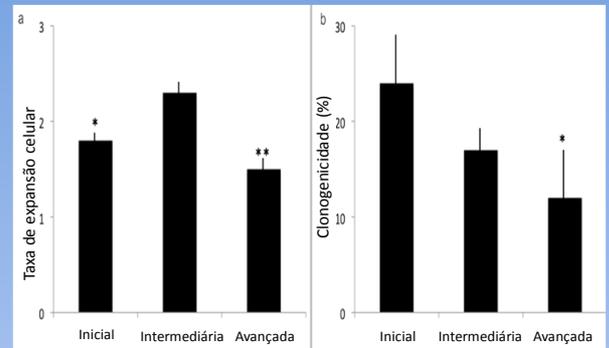


Figura 1: a) Taxa de expansão celular das ASCs: a partir da 30ª passagem, houve redução na taxa de proliferação; b) potencial clonogênico: o potencial clonogênico foi exponencialmente menor nas culturas em passagens avançadas.

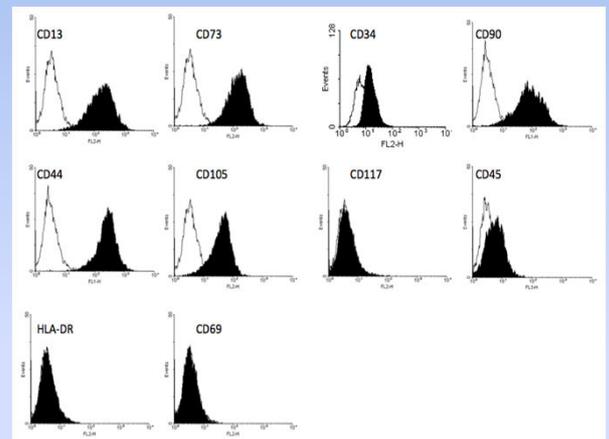


Figura 2: Perfil de expressão dos marcadores de superfície das ASCs durante o cultivo *in vitro*.

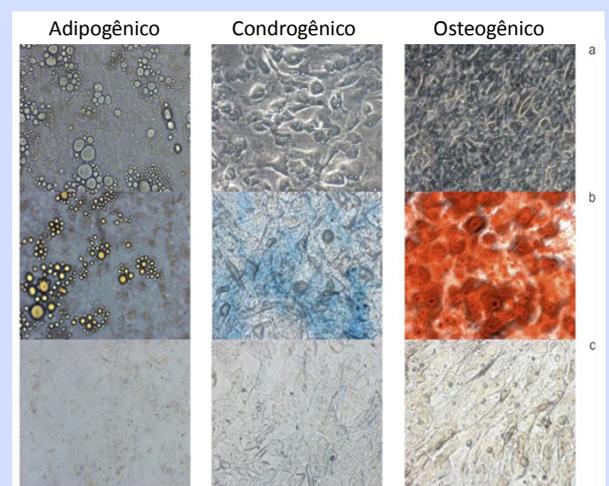


Figura 3: Imagem que representa os resultados da diferenciação das ASCs. **a)** célula diferenciada; **b)** células diferenciadas coradas com corantes específicos (adipo: oil red; condro: alcian blue e osteo: alizarina); **c)** células não diferenciadas. Aumento 100X.

## REFERÊNCIAS

- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin. *BBMC Cell Biol.* 2006;7(14):1-7.
- Castella L, Planat-Bernard V, Laharrague P, Cousin B. *World J Stem Cells.* 2001;3(4):25-33.
- da SILVA ML, Chagastelles PC e Nardi NB. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt-11):2204-13.
- Locke M, Windsor J, Dunbar PR. *ANZ J Surg.* 2009;79(4):235-44.
- Risland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H et al. *Cancer Res* 69(13):5331-9.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. *Cancer Res.* 2005;65(8):3035-9.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Looresz HP, Hedrick MH. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.