

# Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe

Artigo Original

Recebido em 26/02/2008

Aprovado em 30/04/2008

*Pilot protocol for separation and quantification of stem cells from fat tissue of rabbits for posterior use in larynx*

Isis Sousa Oliveira Pereira<sup>1</sup>, Paulo Pontes<sup>2</sup>, Lilian Piñero Eça<sup>3</sup>, Alice Teixeira Ferreira<sup>4</sup>, Paulo Marcelo Vaccari Mazzetti<sup>5</sup>, Leonardo Silva<sup>6</sup>, Flávia Coelho de Souza<sup>7</sup>

1) Bióloga – Instituto de Pesquisa de Células Tronco

2) Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

3) Professora Doutora - Instituto de Pesquisa de Células Tronco

4) Professora Associada - Universidade Federal de São Paulo

5) Cirurgião Plástico

6) Professor Instrutor da Faculdade de Ciências Médicas da Santa casa de São Paulo

7) Veterinária- Doutoranda em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Instituição - Instituto de Pesquisa de Células Tronco – São Paulo, SP – Brasil.

Correspondência – Rua Diogo de Faria 139, São Paulo, SP, Brasil

## RESUMO

**Introdução:** Após a demonstração de que células derivadas da medula óssea são capazes de recrutar um número de linhagens diferentes, incluindo algumas células responsáveis pela osteocartilogênese, diversos meios de cultura e manutenção foram descritos. A grande preocupação em relação aos fatores de sucesso e insucesso dos procedimentos de cultura tem relação com o número de células obtidas nas coletas e sua diferenciação e viabilidade nos meios utilizados. Na Laringologia, um dos grandes desafios clínicos é encontrar materiais de substituição para cartilagens laringotraqueais, subtraídas em procedimentos cirúrgicos e traumas ou destruídas em processos patológicos. **Objetivo:** Avaliar a aplicabilidade de Células Tronco Mesenquimais adultas obtidas de tecido lipoaspirado em meio de cultura **Material e Métodos:** 4 coelhos New Zealand brancos foram submetidos a anestesia geral e sofreram uma incisão longitudinal na linha dorso-medial para liporemoção. As células tronco obtidas foram semeadas em placas de cultura. Foi realizada a contagem das células obtidas para termos conhecimento do número de células amplificado. Ao alcançarmos 70% de

## ABSTRACT

**Introduction:** After the demonstration that bone marrow cells were able to recruit a number of different lineages, including some cells responsible for the osteocartilogeneses, several culture and maintenance means were described. The great concern in relation to the success factors and failure of the culture procedures has relationship with the number of cells obtained in the collections and its differentiation and viability in the several culture means. In Laryngology, one of the great clinical challenges is to find substitution materials for laryngotracheal cartilages. **Objective:** To evaluate the applicability of adult mesenchymal stem cells obtained of fat tissue of rabbits. **Material and Methods:** 4 rabbits New Zealand were submitted to general anesthesia and suffered a longitudinal incision in the back-medial line for liporessection. The stem cells obtained were sowed in culture plates. The counting of the amplified cells was accomplished. To the reach 70% of confluence, the cells of the second passage were triplicated again and counted. **Results:** We obtained an average of  $9 \times 10^6$  viable mesenchymal stem cells by animal with an average about 7 ml of fat tissue for animal. **Conclusion:** The

confluência, as células da segunda passagem foram novamente tripsinizadas e contadas. Resultados: Obtivemos uma média de  $9 \times 10^6$  células tronco mesenquimais váveis por animal com uma média de cerca de 7 ml de tecido adiposo por animal. Conclusão: O protocolo utilizado mostrou-se factível para a obtenção de células tronco a partir de tecido adiposo.

**Descritores:** células tronco mesenquimais; tecido adiposo; coleta; coelhos

protocol used was feasible for the obtaining of stem cells from fat tissue.

**Keywords:** mesenchimal stem cells; fat tissue; harvest; rabbits

## INTRODUÇÃO

A laringe é um órgão extremamente vulnerável. Doenças inflamatórias agudas e crônicas, traumas e neoplasias determinam com frequência o surgimento de complicações que podem evoluir para graves prejuízos da função do órgão. Na prática clínica diária são freqüentes os atendimentos a pacientes com seqüelas destas doenças e de seu tratamento. Tais situações têm impacto definitivo nas funções respiratórias, de deglutição e de comunicação, com grande morbidade e queda da qualidade de vida dos pacientes.

Até mesmo tratamentos considerados conservadores como a radioterapia e quimioterapia podem levar a diversas seqüelas laríngeas. Podemos citar como exemplo a perda da função esfintéfrica da laringe, que leva a quadros extremamente graves como a pneumonia aspirativa. Situações rotineiras como a aspiração broncopulmonar após quimioterapia e radioterapia por câncer laríngeo provavelmente têm prevalência subestimada em função da sua natureza por vezes silenciosa.

O tratamento e a readaptação funcional destes pacientes é extremamente complexo. Entre as opções disponíveis para a reabilitação destaca-se a reconstrução laríngea, o uso de próteses fonatórias e o transplante laríngeo.

Próteses para reabilitação vocal têm sido usadas há algum tempo, porém, com resultados muitas vezes pouco eficazes quando comparados à reabilitação através da voz esofágica. Tratamentos como o transplante laríngeo ainda não têm o resultado esperado embora pesquisas sejam realizadas há mais de 40 anos. A necessidade de uso de esquema imunossupressor pós-operatório, além das seqüelas desencadeadas nas mucosas do trato aerodigestivo são algumas das situações a serem contornadas pela técnica. Além disso, muitas drogas imunossupressoras utilizadas após o transplante na tentativa de evitar-se rejeição têm sido implicadas na gênese de novas neoplasias malignas ou recidivas do quadro inicial.

Até algum tempo acreditava-se que o transplante laríngeo seria a única possibilidade de reabilitação em muitos dos casos anteriormente descritos. Entretanto, dor, disfunções da fala e da deglutição são sempre observadas nos poucos pacientes que foram submetidos a transplantes de laringe.

Outro grande problema enfrentado pelas equipes que realizam transplantes laríngeos está relacionado à seleção dos doadores uma vez que os critérios quanto à saúde da laringe a ser transplantada são pouco flexíveis (quadro 1).

### Quadro 1 - Critério de seleção para doadores de laringe

18-50 anos de idade  
mesmo sexo que receptor  
mesmo sistema ABO que o receptor  
Não fumar ou consumir cocaína e maconha  
Nunca ter sido entubado por mais de 3 dias  
Não ter estado em UTI por mais de 7 dias.

Uma nova proposta para o tratamento de tais condições é a reconstrução laríngea através da utilização da Engenharia de tecidos, lançando mão de células tronco adultas.

Pelas características histológicas de origem mesenquimal que a laringe apresenta (cartilagem e músculo), é possível vislumbrarmos a reconstrução a partir de células gordurosas do adulto.

A laringe é, no entanto, um órgão com características anatómicas extremamente particulares fato que se reflete na sua função especializada. Por exemplo, seu diâmetro interno e sua flexibilidade são diretamente relacionados aos mecanismos respiratórios e de proteção contra aspiração de secreções e alimentos. Além disso, é um órgão tubular e esfintérfico, necessitando de um arcabouço rígido o suficiente para sustentar a pressão negativa dada pelo fluxo de ar e, ao mesmo tempo, ter a flexibilidade necessária para exercer seu papel de esfíncter.

Portanto, o planejamento para a reconstrução da laringe deve contemplar tanto os aspectos de biocompatibilidade e viabilidade do tecido a ser utilizado como matéria prima, como os aspectos mecânicos relacionados à sua arquitetura.

### Células tronco adultas

Friendenstein e colaboradores demonstraram que células derivadas da medula óssea são capazes de recrutar um nú-

mero de linhagens, incluindo algumas células responsáveis pela osteocartilagênese.

Além da habilidade de serem células formadoras de colônias (CFU) uma das características das MSCs são: expressão de um grande número de proteínas (antígenos) na superfície celular (CD44, CD71, CD90, CD105, CD120a, CD124, CD166 e Flt-3 e Kit ligantes) e ausência de antígenos específicos para células da linhagem hematopoiética (Campagnoli et al, 2001). Além disso, algumas células secretam citocinas de memória (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF, GM-CSF) (Majumdar et al, 1998). Estas proteínas podem direcionar as MSCs a se diferenciarem por diferentes linhagens celulares. A diferenciação depende das características biológicas do tecido específico onde as células serão implantadas.

Para identificar e quantificar o nível de MSCs (Mesenchymal Stem Cells) no tecido, é utilizado um ensaio de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F) (Clarke, 2005). Em contrapartida é pouco provável que esta prática de procedimento "in vitro" forneça um número de células tronco que colonizem um tecido específico. Além disso, geralmente o número de células progenitoras no tecido adulto é muito baixo. Por exemplo, na medula óssea adulta existe  $1 \times 10^{(4-6)}$  MSC num total de células por punção aspirada (Kadiyala et al, 1997). Existe uma relação sobre o efeito do número de MSCs e idade do paciente, ou seja, quanto mais idoso o paciente menor o número de MSCs (Bonyadi et al, 2003).

A pluripotencialidade das células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo, nos levou a estudar a capacidade de fixação e manutenção destas células no carreador biodegradável bem como a facilidade de aquisição e abundância deste tecido.

### Aspectos moleculares da Condrogênese

Os condrócitos apresentam formato esférico ou ovóide, com núcleo central e nucléolo bem desenvolvido nas cartilagens em crescimento ativo. No citosol estão todas as organelas necessárias para a síntese protéica. Também é freqüente o acúmulo de glicogênio e vesículas de lipídeos, sobretudo nas áreas mais internas das cartilagens. Eles são células especializadas, que produzem e mantêm a matriz extracelular das cartilagens. Embora haja três tipos de cartilagens, o tipo celular é o mesmo variando apenas no número e em aspectos bio-sintéticos associados à formação de diferentes arranjos da matriz extracelular cartilaginosa. A matriz secretada é basicamente um gel reforçado com fibras produzidas por poucas células.

O colágeno mais abundante nas cartilagens, em geral, é o tipo II. Ele é o principal componente das fibrilas e serve de marcador na diferenciação dos condrócitos.

Os condrócitos originam-se de células tronco mesenquimais adultas, que se reúnem e passam por uma etapa de condensação, quando estabelecem junções entre si, e depois

iniciam a síntese protéica bem como a deposição de matriz extracelular. O tecido passa a ser reconhecido como cartilaginoso quando a matriz produzida separa as células, que assumem um formato arredondado. Neste processo de diferenciação dos condrócitos vários fatores estão envolvidos, dos quais os mais importantes são: os genes *Hedgehog-sonic* e *indian-hedgehog* (SHH); a família das proteínas morfogenéticas de osso (BMP's); e o fator de transcrição Sox9. (CARVALHO, F.H. e cols 2005)

A maior parte dos trabalhos conduzidos com células tronco adultas tem seu interesse voltado para as células tronco mesenquimais extraídas da medula óssea. O tecido adiposo é derivado do mesenquima embrionário e contém um estroma que é isolado facilmente. Alguns estudos têm demonstrado que há um compartimento potencial de células tronco no estroma adiposo. Esta população celular, chamada de lipoaspirado processado (PLA – do processado lipoaspirate) pode se diferenciar em células progenitoras osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas. Entretanto, os processos mais adequados para obtenção do aspirado e a quantidade de células viáveis por tecido ainda não estão bem estabelecidos.

O objetivo deste trabalho é a definição de protocolos específicos para a extração e quantificação de células tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Procedimento cirúrgico de coleta do tecido adiposo

#### Animais

Dados de estudos recentes demonstram que há no local da coleta do tecido adiposo cerca de 4 a 5g de tecido por kg do animal. A partir desta informação utilizamos neste processo de coleta 4 animais, com o intuito de obter entre 15 e 20g de tecido adiposo, representando uma expectativa de  $40 \times 10^6$  células mesenquimais em cultura após amplificação.

#### Anestesia

Os animais foram submetidos a anestesia geral produzida por uma injeção intramuscular de Ketamina. O antibiótico Clindamicina foi administrado profilaticamente.

#### Coleta do Tecido Adiposo

Ao longo da linha dorso medial localizamos uma grande quantidade de tecido adiposo, há aproximadamente 5cm do occipito, na direção crânio-caudal.

Após cuidados específicos de assepsia e antisepsia, em ambiente cirúrgico estéril, foi realizada uma incisão cirúrgica longitudinal de 5 cm na linha dorso-medial, acima do local de maior acúmulo de tecido adiposo do animal, para que fosse realizada uma lipectomia em bloco (Figs. 1,2,3,4,5,6 e 7).



Figura 1 - Coelho na posição de coleta da gordura

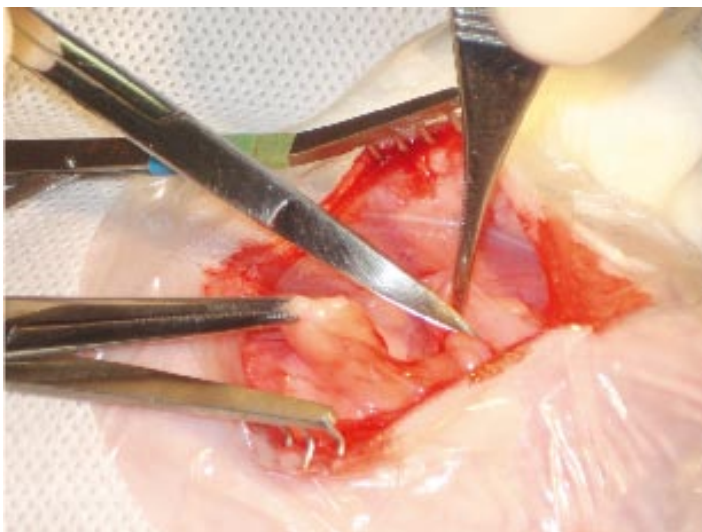


Figura 2 - Confecção da loja de remoção de gordura em bloco.

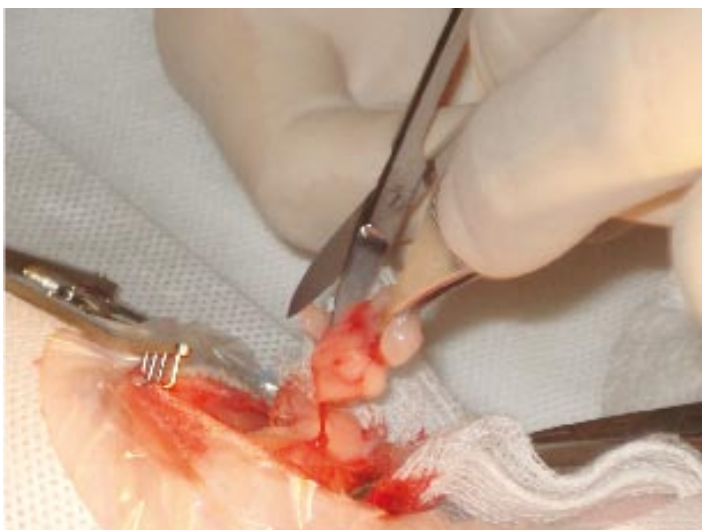


Figura 3 - Fragmentação da gordura previamente ao armazenamento e processamento.



Figura 4 - coleta da gordura no centro cirúrgico.



Figura 5 - Sutura do animal



Figura 6 - Armazenamento do material em PBS previamente à amplificação.



Figura 7 - Tubos de cultura de células

## Separação, Cultivo e Contagem das Células Tronco

### Separação das Células Tronco

Foi utilizado o volume total coletado da massa de tecido adiposo, que foi primeiramente fragmentado e depois lavado com PBS 2% estéril, e posteriormente transportado com essa mesma solução até o laboratório. Após a lavagem do tecido, em um fluxo laminar devidamente esterilizado, e com o manuseio adequado, este material passou por processo enzimático de digestão celular. A solução de colagenase A (2mg/ml) em meio DMEM (Meio de Eale e Dulbecco Modificado), contendo BSA (20mg/ml) além de penicilina e estreptomina, foi utilizada por grama de tecido para digestão tecidual durante 50 minutos, à 37°C em constante movimento. Após esse tempo de encubação enzimática, o processo foi interrompido com a adição de BFS (blood fasting sugar). A suspensão de células que obtida foi centrifugada por 5 min à 2000rpm, sendo desprezado o sobrenadante (fração adiposa) após a centrifugação e o pellet formado (fração estromal) re-suspendido em meio DMEM já suplementado à 10% de BFS.

### Cultivo das células MSCs

As células tronco obtidas foram semeadas em placas de cultura de 25ml de volume à razão de  $2,5 \times 10^5$  células por placa e cultivadas em meio DMEM contendo 10% de Soro Bovino Fetal, suplementado com penicilina 62ug/ml e estreptomina 50ug/ml. A partir das primeiras 48 horas, o meio foi trocado a cada dois dias, sendo que as duas primeiras trocas foram intermediadas por uma lavagem com PBS, para retirar todo resíduo de eritrócitos ou tecido adiposo que pudesse ter restado na placa. Essas trocas seguiram até que as células alcançassem aproximadamente 70% de confluência, quando foram submetidas a tripsinização.

### Expansão das células MSCs

O processo de tripsinização celular é conhecido como expansão celular. O processo se dá com a retirada do meio de cultura utilizado, adicionando 3ml de PBS para lavagem e retirada total de qualquer vestígio do meio de cultura. Em seguida faz-se a sucção do PBS e adiciona-se 1ml de solução de tripsina a 0,2%. As placas foram mantidas a 37 graus, em agitação constante, por 2 a 3 minutos até que as células soltassem completamente da placa. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 10 ml de meio DMEM contendo 10% de Soro Bovino Fetal. As células das placas, após serem re-suspendas e contadas, foram novamente semeadas à razão de  $2,5 \times 10^5$  células por placa de 25ml de volume promovendo assim sua expansão

### Contagem e Coloração Vital das Células Tronco

A contagem das células foi realizado na Câmara de Neubauer nos quadrantes laterais (Fig. 8). Foi feita a somatória do número celular em cada quadrante e posteriormente multiplicada por  $10^4$  obtendo assim o número exato de células. Após isto foi feita a coloração destas células com o corante *Trian Blue*. Esta substância tem a propriedade de somente corar as células cuja membrana já tenha sido degradada, ou seja, células mortas. Sendo assim, quanto menos células coradas maior a viabilidade delas.

## RESULTADOS

A quantidade de gordura obtida com o procedimento foi em média de 7ml (2ml, 6ml, 10ml, 10ml).

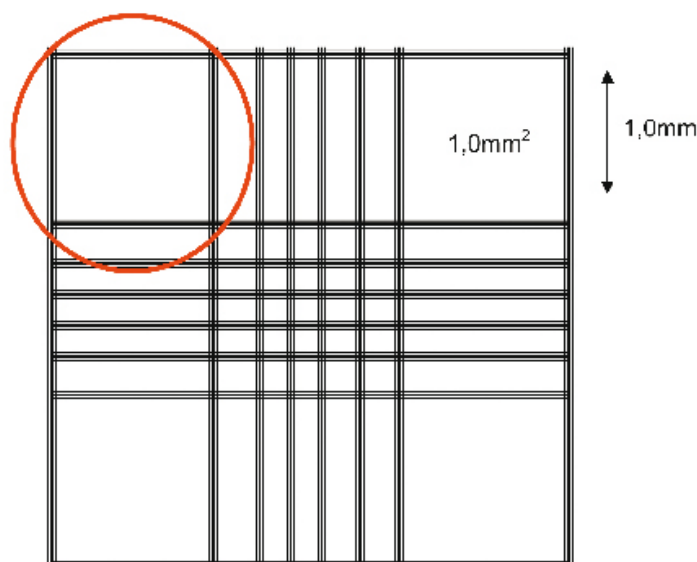


Figura 8 - Reticulado de contagem de células. Circulo mostra quadrante de contagem.

O tempo cirúrgico variou de 15 minutos a 30 minutos. Todos os animais permaneceram sem intercorrências nos primeiros 3 dias de pós-operatório, mas por razões desconhecidas pararam de comer e vieram a falecer até o 7 dia (3 animais). A quantidade de células obtidas por animal foi bastante estável, não havendo uma correlação perceptível com o volume removido.

As células viáveis, obtidas de cada um dos animais foi de  $12 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$  e  $8 \times 10^6$ .

## DISCUSSÃO

A possibilidade de obtenção de células tronco nesta quantidade a partir de tecido adiposo de região dorsal de coelhos, pode ser de enorme valia para os estudos de amplificação com inte-

resse em tecidos mesenquimais como cartilagem e ossos.

O protocolo seguido mostrou-se de fácil reprodutibilidade, com poucas situações que possam gerar contaminação da amostra e com pequenas repercussões para os animais.

Infelizmente houve a morte de três de nossos coelhos, aparentemente por motivos alheios ao procedimento, visto que não mostraram sinais de infecção ou sofrimento.

Como os roedores mostram outras regiões de acúmulo adiposo de fácil acesso, como a região anterior das escápulas, provavelmente será este o próximo local a ser testado.

## CONCLUSÃO

O protocolo utilizado mostrou-se factível para a obtenção de células tronco a partir de tecido adiposo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chiang, C. et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413 (1996).
- Muenke, M. et al. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet.* 8, 269-274 (1994).
- Wilkie, A. O. M. et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nature Genet.* 9, 165 – 172 (1995).
- El Ghouzzi, V. et al. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet.* 15, 42 – 46 (1997).
- Howard, T.D. et al. Mutations in TWIST, a basic helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet.* 15, 36 – 41(1997)
- Mavrogiannis, L.A. et al. Haploinsufficiency of the human homeobox gene ALX4 causes skull ossification defects. *Nature Genet.* 27, 17 – 18 (2001).
- Lohnes, D. et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. I. Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120, 2723 – 2748 (1994).
- Nottoli, T., Hagopian – Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A. & Williams, T. AP-2 – null cells disrupt morphogenesis of eye, face and limbs in chimeric mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 13714 – 13719 (1998).
- Muenke, M. & Beachy, P.A. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8 th edn (eds Scriver, C.R. et al. ) 6203 – 6230 ( Mc Graw – Hill, New York, 2001).
- Echelard, Y. et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417 – 1430 (1993).
- Blot WJ. *The Epidemiology of Cancer*. In: Bennet JC, Plum F, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996. p. 1020-4. [ Links ]
- Gartner L P, Hiatt J L, "Tratado de Histologia", 2ª edição, Guanabara Koogan, 2003; 281-98
- Carvalho H F e cols, "Célula: Uma abordagem multidisciplinar", 1ª edição, Editora: Manole, 2005, 11-20
- Torres F C e cols, "Stem Cells from the fat tissue of rabbits: An easy to find experimental source", *Aesthetic Plastic Surgery* 31:1-6, 2007.
- Zuk, PA, Zhu, M, Ashjian, P, De Ugarte, DA, Huang, JI, Mizuno, H, Alfonso, C, Fraser, JK, Benhaim, P, Hedrick M. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *MBC in Press*, 10.1091/mbc.E02-02-0105 on September 24, 2002 Vol. 13, Issue 12, 4279-4295, December 2002