

Rendimento de Células Mesenquimais do Tecido Adiposo Submetidas a Diferentes Protocolos de Extração

Adipose-Derived Mesenchymal Cells Yield Under Different Cell Extraction Protocols

FERNANDA GINANI¹
DIEGO MOURA SOARES²
CARLOS AUGUSTO GALVÃO BARBOZA³

RESUMO

Objetivo: Estabelecer um protocolo de extração de células mesenquimais do tecido adiposo, a partir da avaliação do rendimento celular em dois métodos de digestão enzimática do tecido. **Material e Métodos:** Fragmentos de tecido adiposo foram extraídos da região inguinal de camundongos e processados por dois protocolos distintos: Grupo 1 – digestão enzimática com colagenase I; Grupo 2 – digestão enzimática com colagenase I e tripsina/EDTA, ambos por 1 hora a 37°C. No terceiro subcultivo (P3) as células dos dois grupos foram submetidas a contagem em Câmara de Neubauer para avaliação da proliferação celular e obtenção da curva de crescimento nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Foi realizada a marcação pelo DAPI no intervalo de 72 horas, nos grupos estudados, para avaliar a existência de danos morfológicos nucleares. Os dados foram analisados estatisticamente, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Os dois grupos exibiram um padrão de crescimento celular ascendente. As médias das contagens celulares demonstraram uma maior proliferação celular no grupo I, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos intervalos de 48 e 72 horas ($p < 0,05$). Alterações morfológicas nucleares não foram observadas nos grupos. **Conclusão:** A digestão enzimática do tecido adiposo por colagenase I, sem associação com a tripsina, proporcionou melhor rendimento das células mesenquimais, o que favorece a escolha desse protocolo em experimentos com este tipo celular.

DESCRIPTORIOS

Tecido Adiposo. Técnicas de Cultura de Células. Proliferação Celular.

ABSTRACT

Objective: To establish a protocol for extraction of adipose-derived mesenchymal cells, evaluating the cell yield in two methods of tissue enzymatic digestion. **Material and Methods:** Fragments of adipose tissue were removed from the inguinal region of mice and processed by two different protocols: Group 1 - enzymatic digestion with collagenase I; Group 2 - enzymatic digestion with collagenase I and trypsin/EDTA, both for 1 hour at 37°C. In the third passage (P3), cells from both groups were counted in a Neubauer chamber for evaluation of cell proliferation, and growth curves were plotted at intervals of 24, 48 and 72 hours. The DAPI nuclear staining was performed in both groups in a 72-hour interval to evaluate the presence of nuclear morphological damage. Data were analyzed statistically with a significance level of 5%. **Results:** The two groups showed an upward pattern of cell growth. The mean cell counts showed a higher cell proliferation in group I, with a statistically significant difference between groups in intervals of 48 and 72 hours ($p < 0.05$). Nuclear morphological changes were not observed in the groups. **Conclusion:** The enzymatic digestion of adipose tissue by collagenase I, without association with trypsin, improves the yield of mesenchymal cells, what suggests the choice of that protocol in experiments with this cell type.

DESCRIPTORS

Adipose Tissue. Cell Culture Techniques. Cell Proliferation.

- 1 Biomédica. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.
- 2 Cirurgião-Dentista. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Odontologia. Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.
- 3 Doutor em Patologia Bucal. Professor Associado do Departamento de Morfologia e do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.

O isolamento de uma população de células progenitoras do tecido adiposo de roedores foi descrito pela primeira vez por RODBELL (1964). VAN, RONCARI (1977) relataram que o tecido adiposo de ratos adultos contém células com potencial para proliferar e adquirir características morfológicas semelhantes às de adipócitos.

Após a introdução da lipoaspiração, a obtenção de tecido adiposo se tornou mais fácil (ILLOUZ, 1983). Em 2001, uma modificação nos métodos de isolamento existentes utilizando resíduos de lipoaspiração como matéria-prima demonstrou o potencial desta fonte de tecido abundante para futuras terapias clínicas. O tecido adiposo humano, obtido por lipoaspiração, foi processado para a obtenção de uma população de células semelhantes a fibroblastos, que foram mantidas *in vitro* por períodos prolongados com um crescimento celular estável e baixos níveis de senescência. A citometria de fluxo e a imunofluorescência mostraram que a maioria dessas células era de origem mesodérmica ou mesenquimal (ZUK *et al.*, 2001).

Embora haja alguns debates envolvendo a origem de células-tronco no tecido adiposo - se realmente se originam no tecido adiposo, ou são, talvez, células-tronco mesenquimais do sangue periférico que passam pelo tecido adiposo - esse tecido representa uma fonte fácil e disponível para o isolamento de células-tronco potencialmente úteis que podem ser obtidas em grandes quantidades com morbidade mínima (LEVI, LONGAKER, 2011, STERODIMAS *et al.*, 2010). No entanto, a padronização dos métodos para preparação do tecido, isolamento das células e cultivo das mesmas ainda se faz necessário.

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de extração de células mesenquimais do tecido adiposo, a partir da avaliação do rendimento celular após o processamento tecidual por dois métodos de digestão enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela CEUA/UFRN (protocolo 008/2009). Células mesenquimais do tecido adiposo foram obtidas de dois camundongos albinos Swiss machos, com dois meses de idade e 30g de peso. Após a eutanásia, fragmentos do tecido adiposo foram coletados da região inguinal e mantidos em tampão fosfato (PBS) até seu processamento. Em câmara de fluxo laminar, o fragmento tecidual foi cortado em fragmentos menores e submetidos a três lavagens, de 10 minutos cada, com uma solução contendo meio α -MEM (Cultilab, Brasil) enriquecido com antibiótico e

antifúngico (Gibco, USA), objetivando eliminar possível contaminação.

Posteriormente, os fragmentos de tecido adiposo foram submetidos a dois protocolos para extração de células mesenquimais:

- Grupo I: digestão enzimática com solução contendo 3 mg/mL de colagenase I (Gibco).
- Grupo II: digestão enzimática com solução contendo 3 mg/mL de colagenase I (Gibco) e 1mL de tripsina/EDTA (Cultilab).

Ambos os grupos foram incubados em placa de Petri, por 1 hora a 37°C. Em seguida, o material resultante da digestão enzimática foi transferido para um tubo cônico tipo Falcon, adicionado 5 mL de PBS e centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. Os adipócitos presentes no sobrenadante foram aspirados e as células precipitadas foram submetidas a uma nova centrifugação com PBS. O pellet celular foi processado em uma peneira de 70 μ m e as células foram cultivadas em meio α -MEM contendo antibiótico (Cultilab) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ até atingirem 70 – 90% de confluência, com troca de meio a cada três dias.

Com a finalidade de identificar a natureza multipotencial das células, as mesmas foram cultivadas em meios de diferenciação osteogênico e adipogênico (StemPro® Differentiation Kits, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) por até 21 dias. Após este período, as células exibiram, na microscopia de luz, morfologia característica de células osteoblásticas e adiposas.

No terceiro subcultivo (P3), as células foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 3x10⁴ células/poço, durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento, com o objetivo de avaliar o rendimento celular e obter a curva de crescimento nos diferentes grupos. Decorridos os tempos experimentais, as células foram submetidas à análise da adesão e proliferação celular utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán em câmara de Neubauer. A existência de alterações morfológicas no núcleo das células estudadas foi avaliada através da marcação pelo DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole), em microscópio de fluorescência, no intervalo de 72h.

Os dados obtidos foram submetidos à análise não paramétrica. Cada valor das contagens celulares correspondeu à média \pm desvio padrão da média de 4 amostras por intervalo em cada grupo. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os dois protocolos estudados permitiram um padrão de crescimento ascendente das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo, como mostra a Figura 1.

A extração realizada apenas com collagenase exibiu um índice proliferativo estatisticamente mais acentuado quando comparada com a que utilizou

collagenase associada à tripsina/EDTA. Verificou-se significância estatística entre os grupos nos intervalos de 48 e 72h (Tabela 1).

Na análise em microscopia de fluorescência não foram observadas alterações morfológicas, como fragmentações nucleares e núcleos picnóticos, nas células mesenquimais extraídas por meio dos protocolos estudados (Figura 2).

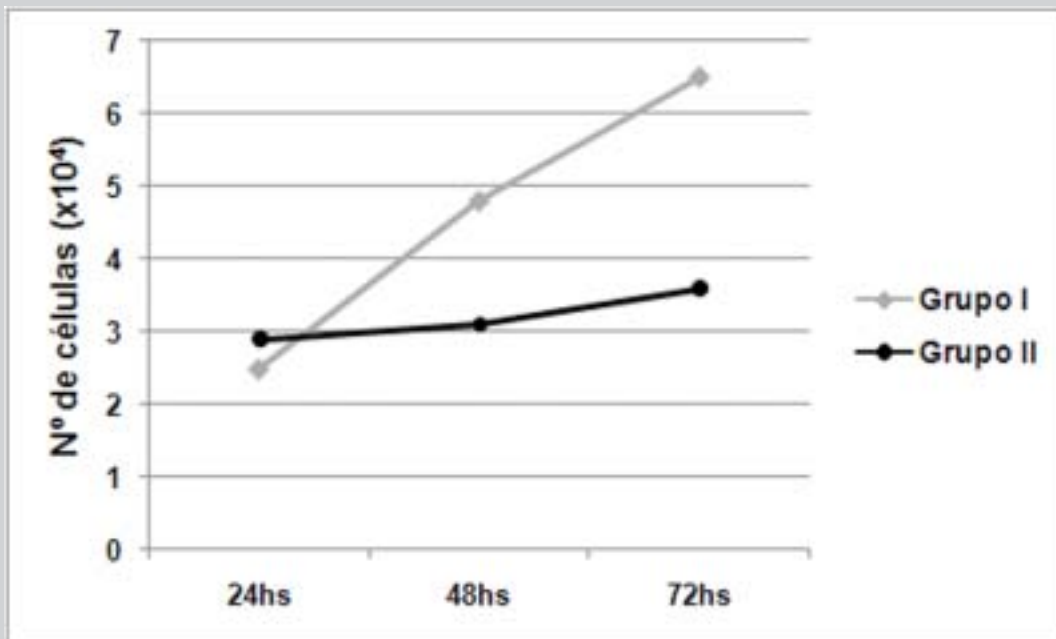


Figura 1. Curva de crescimento das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo nos intervalos de tempo estudados.

Tabela 1. Médias e desvio-padrão das contagens celulares nos diferentes grupos.

	Grupo I	Grupo II	<i>p</i> *
T24	2,5 ± 0,6	2,9 ± 0,3	0,4047
T48	4,8 ± 0,5	3,1 ± 0,6	0,0265
T72	6,5 ± 0,4	3,6 ± 0,5	0,0294

*Mann-Whitney. Os números em negrito indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

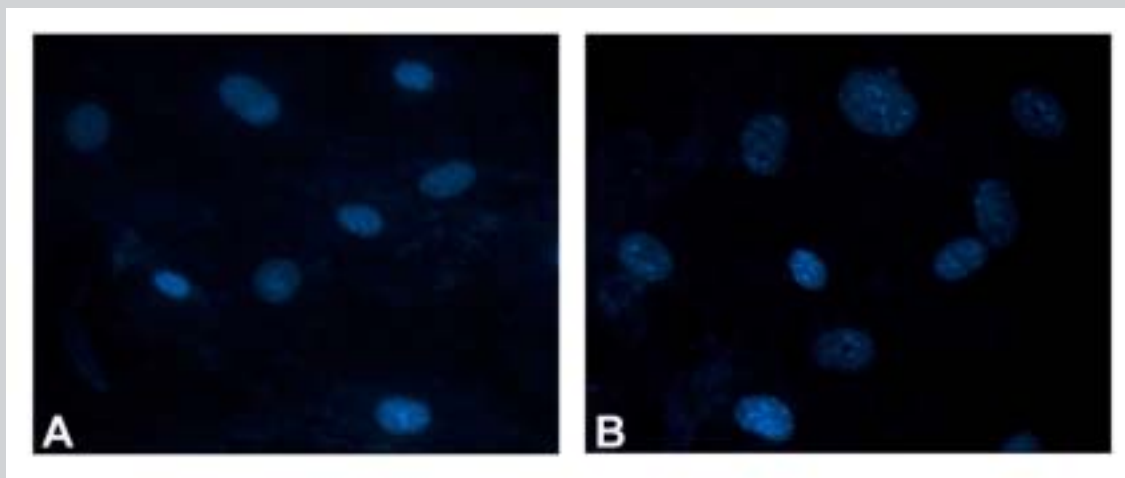


Figura 2 - Fotomicrografia das células do Grupo I (A) e Grupo II (B), após 72 horas de cultivo celular. (Coloração DAPI, 40x)

DISCUSSÃO

O tecido adiposo representa uma fonte abundante de células-tronco com grande plasticidade, de fácil acessibilidade e extremamente disponível em procedimentos de lipoaspiração (LEVI, LONGAKER, 2011). Mesmo após algumas décadas do isolamento de células-tronco do tecido adiposo, os protocolos para a extração desse tipo celular ainda não estão bem estabelecidos. Diversos protocolos para digestão tecidual têm sido descritos, sendo a colagenase tipo I – com ou sem associação a outra solução – a enzima mais utilizada (DE GIROLAMO *et al.*, 2011, FAUSTINI *et al.*, 2010). A literatura revela que uma digestão efetiva também pode ser obtida com colagenase tipo II (GASTALDI *et al.*, 2010), enzima RTase (KO *et al.*, 2011), colagenase tipo II com solução salina balanceada de Hank's (TALÉNS-VISCONTI *et al.*, 2006) e colagenase tipo I associada à tripsina (ZHU *et al.*, 2008), à albumina de soro bovino (LEE, KIM, KIM, 2010), ao tampão fosfato salino (GONDA *et al.*, 2008, LIU *et al.*, 2008) ou ao tampão fosfato salino com soro bovino (MARINO *et al.*, 2010, MITCHELL *et al.*, 2006).

Normalmente a extração celular de um tipo de tecido específico é realizada com base em protocolos que foram estabelecidos, esperando que rendimentos semelhantes sejam conseguidos posteriormente.

Quando se busca extrair células-tronco de tecidos dentais (polpa e ligamento periodontal), por exemplo, a associação da colagenase I com a dispase é bastante realizada (VASCONCELOS *et al.*, 2011, PAPACCIO *et al.*, 2006); todavia, esta última enzima não é utilizada na digestão do tecido adiposo.

Neste estudo, optamos por testar a capacidade proliferativa das células obtidas após o processamento tecidual com colagenase tipo I isoladamente ou associada à tripsina/EDTA. Com isso, observamos um melhor rendimento celular quando a extração é realizada sem a associação da colagenase com a tripsina/EDTA. Os resultados menos favoráveis do rendimento celular para o grupo extraído com colagenase e tripsina/EDTA pode ser explicado pelo fato de que a tripsina, quando utilizada por um longo período de tempo, pode clivar receptores de fatores de crescimento na superfície celular ou proteínas de membrana, comprometendo a atividade celular (HUANG *et al.*, 2010).

Em relação aos possíveis danos morfológicos nucleares, estes não foram verificados em nenhum dos protocolos utilizados no presente estudo, demonstrando que a ação das duas enzimas restringe-se à membrana celular.

Os resultados deste estudo mostram uma maior capacidade proliferativa das células quando a digestão enzimática do tecido adiposo é realizada com colagenase,

corroborando com os resultados encontrados por DE GIROLAMO *et al.*, (2011) e FAUSTINI *et al.*, (2010). Este fato contribui para a utilização deste protocolo para isolamento de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo para utilização em futuras terapias regenerativas, visto que se faz necessário uma quantidade adequada de células viáveis para aplicação clínica.

CONCLUSÃO

A digestão enzimática do tecido adiposo por collagenase, sem associação com a tripsina, proporcionou melhor rendimento das células mesenquimais, o que favorece a escolha desse protocolo em estudos posteriores com este tipo celular.

REFERÊNCIAS

1. DE GIROLAMO L, ARRIGONI E, STANCO D, LOPAS, DI GIANCAMILLO A, ADDIS A, BORGONOVO S, DELLAVIA C, DOMENEGHINI C, BRINI AT. Role of autologous rabbit adipose-derived stem cells in the early phases of the repairing process of critical bone defects. *J Orthop Res*, 29(1):100-108, 2011.
2. FAUSTINI M, BUCCO M, CHLAPANIDAS T, LUCCONI G, MARAZZI M, TOSCA MC, GAETANI P, KLINGER M, VILLANI M, FERRETTI VV, VIGO D, TORRE ML. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(6):1515-1521, 2010.
3. GASTALDI G, ASTIA, SCAFFINO MF, VISAI L, SAINO E, COMETAAM, BENAZZO F. Human adipose-derived stem cells (hASCs) proliferate and differentiate in osteoblast-like cells on trabecular titanium scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 1;94(3):790-799, 2010.
4. GONDAK, SHIGEURAT, SATO T, MATSUMOTO D, SUGA H, INOUE K, AOI N, KATO H, SATO K, MURASE S, KOSHIMA I, YOSHIMURA K. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*, 121(2):401-410, 2008.
5. HUANG HL, HSING HW, LAI TC, CHEN YW, LEE TR, CHAN HT, LYU PC, WU CL, LU YC, LIN ST, LIN CW, LAI CH, CHANG HT, CHOU HC, CHAN HL. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci*, 17(1):36-45, 2010.
6. ILLOUZ YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*, 72(5):591-597, 1983.
7. KO MS, JUNG JY, SHIN IS, CHOI EW, KIM JH, KANG SK, RA JC. Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse. *Int J Med Sci*, 8(3):231-238, 2011.
8. LEE JE, KIM I, KIM M. Adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells obtained from cryopreserved adipose aspirates. *Dermatol Surg*, 36(7):1078-1083, 2010.
9. LEVI B, LONGAKER MT. Adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells*, 29(4):576-582, 2011.
10. LIU G, ZHOU H, LI Y, LI G, CUI L, LIU W, CAO Y. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, 57(1):18-24, 2008.
11. MARINO G, ROSSO F, CAFIERO G, TORTORAC, MORACI M, BARBARISI M, BARBARISI A. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*, 21(1):353-363, 2010.
12. MITCHELL JB, MCINTOSH K, ZVONIC S, GARRETT S, FLOYD ZE, KLOSTER A, DI HALVORSEN Y, STORMS RW, GOH B, KILROY G, WU X, GIMBLE JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2):376-385, 2006.
13. PAPACCIO G, GRAZIANO A, D'AQUINO R, GRAZIANO MF, PIROZZI G, MENDITTI D, DE ROSAA, CARINCI F, LAINO G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 208(2):319-325, 2006.
14. ROBBELL M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem*, 239(1):753-5, 1964.
15. STERODIMASA, DE FARIA J, NICARETTAB, PITANGUY I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63(11):1886-1892, 2010.

16. TALÉNS-VISCONTI R, BONORAA, JOVER R, MIRABET V, CARBONELL F, CASTELL JV, GÓMEZ-LECHÓN MJ. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*, 12(36):5834-5845, 2006.
17. VAN RL, RONCARI DA. Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell Tissue Res*, 181(2):197-203, 1977.
18. VASCONCELOS RG, RIBEIRO RA, VASCONCELOS MG, LIMA KC, BARBOZA CA. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank*, 2011. doi: 10.1007/s10561-011-9271-3.
19. ZHU Y, LIU T, SONG K, FAN X, MA X, CUI Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*, 26(6):664-675, 2008.
20. ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2):211-228, 2001.

Correspondência:
Carlos Augusto Galvão Barboza
Departamento de Morfologia, UFRN
Av Salgado Filho, 3000 – Campus Universitário
59072-970 Natal, RN – Brasil
Telefone: (84) 3215-3431
e-mail: cbarboza@cb.ufrn.br