

PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO OMENTO MAIOR, TECIDO ADIPOSEO PERIRRENAL E BOLSA ADIPOSEA INTERESCAPULAR EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho^{1*}
Tiago Luis Eilers Treichel¹
Jaime Sardá Aramburú Junior¹
Maurício Borges da Rosa¹
Maurício Veloso Brun²
Marcella Teixeira Linhares³
Bianca Eidt Rodrigues⁴
Alexandre Krause²
Marcos André Braz Vaz⁵
Fabiola Dalmolin¹
Ney Luis Pippi²

RESUMO

O tecido adiposo é fonte alternativa de células-tronco mesenquimais, apresentando-se como método menos invasivo e permitindo coleta de maior quantidade celular em comparação a medula óssea (MO). Nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Em camundongos, foram observadas diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs), de acordo com as regiões anatômicas. O objetivo deste trabalho é comparar a proliferação e viabilidade de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da bolsa adiposa interescapular, do omento maior e da gordura da região perirrenal de coelhos. Para isso, três coelhos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para remoção de tecido adiposo do omento maior, região perirrenal e bolsa adiposa interescapular. As células foram processadas e cultivadas em atmosfera umidificada a CO₂ 5%, sendo posteriormente coradas com Azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. Concluí-se que houve variação na capacidade proliferativa das CTMs em relação as regiões estudadas, com vantagem da gordura omental sobre as outras duas regiões. A viabilidade das CTMs das três regiões apresentou variação durante as passagens.

Palavras-chave: terapia celular, cirurgia, coelhos, CTM.

PROLIFERATION AND VIABILITY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM OMENTUM, FAT PERIRENAL AND ADIPOSE INTERSCAPULAR POUCH IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)

ABSTRACT

Adipose tissue is an alternative source of mesenchymal stem cell. It can be obtained by less invasive method and in larger quantities when compared with bone marrow. In humans, adipose tissue metabolism differs according to anatomic location. In mice, according to the

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) *Correspondência. Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203 – Santa Maria, RS. 97060-330. saulovet2011@hotmail.com

² Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM.

³ Programa de Residência Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde, UFSM.

⁴ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, UFSM.

⁵ Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UFSM.

anatomical regions, differences were observed in cellular composition and differentiation capacity of adipose-derived stromal cells (ADSCs). The objective of this study is to compare the viability and proliferation of mesenchymal stromal cells (MSC) derived from the bag interscapular fat, omental and perirenal fats of rabbits. For this, three rabbits were undergone to surgical collect fat from difference sites. Cells were processed and grown in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, and subsequently they were stained with Trypan blue and counted in a Neubauer chamber. It was concluded that there was variation in the proliferative capacity of MSCs over the regions studied, with advantage of great omental fat about the other regions. The viability of MSCs from the three regions showed variation during passages.

Keywords: cell therapy, surgery, rabbits, MSC.

PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DERIVADAS DEL ESTROMA MESENQUIMAL DE EPIPLÓN, EL TEJIDO ADIPOSO PERIRRENAL Y EL BOLSO DE GRASA INTERESCAPULAR EN CONEJOS (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMEN

El tejido adiposo es una fuente alternativa de células madre mesenquimales, se presenta como el número de aumento de la colección de células menos invasiva y permitiendo comparación con el método de la médula ósea (MO). En los seres humanos, el metabolismo del tejido adiposo difiere de acuerdo con la localización anatómica. En ratones, se observaron diferencias en la composición celular y la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC), de acuerdo a las regiones anatómicas. El objetivo de este estudio es comparar la proliferación y la viabilidad de las células mesenquimales estromales multipotentes (CTMs) derivados de la bolsa de grasa interescapular, el epiplón mayor y la grasa perirrenal de conejos. Para esto, tres conejos fueron sometidos a cirugía para la extirpación de un tejido adiposo omental, perirrenal y interescapular abultada bolsa. Las células se procesaron y se cultivaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, y posteriormente se tiñeron con azul de tripano y se contaron en una cámara de Neubauer. Llegamos a la conclusión de que hubo una variación en la capacidad proliferativa de CTMs con respecto a las regiones estudiadas, con la ventaja de la grasa omental en las otras dos regiones. La viabilidad de CTMs las tres regiones mostró variación durante los pasajes.

Palabras clave: terapia celular, cirugía, conejos, células madre mesenquimales.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram isoladas inicialmente em 1976, como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblastos *in vitro* (CFU-F) (1). Em 1991 o termo CTM foi definido como uma célula capaz de dar origem a outras linhagens celulares diferentes da sua origem (2). Em 2005, padronizando a nomenclatura, o Comitê de Células-tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu as características das CTMs como: devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; devem expressar CD105, CD73 e CD90, e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR; devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (1).

As MSCs são consideradas linhagem de células-tronco somáticas, estando presentes em regiões perivascularas de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo na medula óssea (MO), no tecido adiposo, no periósteo, no tecido muscular e nos órgãos parenquimatosos. A MO constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais. As MSCs caracterizam-se como população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras. Tais características de plasticidade sugerem que as MSCs são responsáveis pela renovação e manutenção de todos os tecidos do organismo. Elas tornaram-se foco de numerosas pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular (3,4).

O tecido adiposo (TA) é fonte celular alternativa de MSCs, a qual pode ser obtida por um método menos invasivo e em maiores quantidades do que na MO. Tem sido demonstrado que o TA contém células-tronco semelhantes as da MO, denominadas de lipoaspirado processado (LAP). Em humanos, estas células podem ser isoladas em grande número a partir de lipoaspirações cosméticas e facilmente cultivadas, inclusive com condições de cultura de tecidos. A capacidade de diferenciação em multilinhagens destas células foi confirmada por pesquisas (5).

Pereira et al. (6), objetivando definir protocolos específicos para a extração e quantificação de células tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo excisado em coelhos Nova Zelândia, realizaram lipectomia em bloco na região dorsal, 5cm caudal a região occipital. Os autores concluíram que o protocolo seguido mostrou-se de fácil reprodutibilidade, com poucas situações que possam gerar contaminação da amostra e com pequenas repercussões para os animais, mostrando-se factível para a obtenção de células-tronco a partir de tecido adiposo.

Com o objetivo de estabelecer modelo experimental versátil e que satisfizesse várias áreas de interesse, Torres (7) propôs o coelho como fonte de de tecido adiposo, utilizando como local de coleta a bolsa adiposa interescapular. O pesquisador concluiu que o coelho da raça Nova Zelândia pode ser considerado um modelo adequado pelo grande e localizado acúmulo de tecido adiposo. O autor afirma que a captação tecidual por lipoaspiração é rápida, eficaz e com baixa morbidade, além de que a bolsa adiposa interescapular apresenta quantidade significativa de tecido adiposo.

Kern et al. (5) compararam as MSCs derivadas da MO, TA (ADSCs) e sangue do cordão umbilical (SCU) em relação a morfologia, taxa de sucesso de isolamento, frequência da colônia, potencial de expansão, a capacidade de diferenciação múltipla e o fenótipo imunológico. Os autores verificaram que as células derivadas do SCU e TA são alternativas atraentes à MO para isolamento. O TA contém MSCs com maior frequência e o SCU parece ser mais vantajoso em relação ao potencial de expansão destas células.

Nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Em camundongos, pesquisadores observaram diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das ADSCs, de acordo com as regiões anatômicas (8). Assim, parece provável que o tecido adiposo humano seja composto de diferentes subtipos de células-tronco, dependendo da localização anatômica. No entanto, são necessários mais estudos comparativos acerca da natureza celular e do potencial de diferenciação das ADSCs isoladas do tecido adiposo de regiões anatômicas distintas, com atenção, também, ao tipo de procedimento cirúrgico e/ou laboratorial empregado (9).

Segundo Prunet-Marcassus et al. (10), tecidos adiposos branco e marrom são amplamente reconhecidos como diferentes em termos de metabolismo e composição celular. Os depósitos de tecido adiposo branco de sítios anatômicos diferentes, especialmente do espaço subcutâneo em relação aos sítios internos, também exhibe propriedades metabólicas e

funções diferentes. Os autores concluíram em seus estudos que o tecido adiposo aparece como tecido complexo, composto de subconjuntos de células diferentes de acordo com a natureza e o local anatômico. Também sugerem que outras investigações deste tipo levarão ao surgimento de novas idéias fundamentais para fazer progredir o conhecimento da biologia do tecido adiposo.

Sakaguchi et al. (11) compararam as propriedades de células-tronco mesenquimais (MSCs) humanas, derivadas do osso, da medula óssea, da sinóvia, do periósteo, do músculo esquelético e do tecido adiposo. Entre as propriedades avaliadas estavam rendimento e capacidade de expansão celular. Os autores demonstraram diferenças significativas nas propriedades estudadas dependendo da fonte de origem. Estes resultados podem fornecer informações importantes na escolha do tecido mesenquimal ideal como fonte de células, potencializando sua utilidade clínica.

O objetivo deste trabalho é comparar a proliferação e viabilidade de CTMs após coleta de gordura do omento maior, região perirrenal e da bolsa adiposa interescapular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração do estudo foram utilizados três coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos adultos, raça Nova Zelândia Branco, clinicamente saudáveis, com peso médio de 3,33kg, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais, por um período mínimo de 15 dias para sua adaptação às condições ambientais e ao convívio humano, bem como para a detecção de possíveis enfermidades. Durante todo o período do experimento, os animais permaneceram em ambiente climatizado, recebendo ração e água a vontade.

Após o período de adaptação dos animais, os mesmos foram separados e identificados em três unidades experimentais (C1, C2 e C3), para posterior coleta da gordura dos locais previamente determinados. Os três animais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos para coleta de tecido adiposo. Os locais previamente escolhidos foram a bolsa adiposa interescapular, o omento maior e a gordura perirrenal (Tabela 1). Logo após os procedimentos, realizados no mesmo dia e turno, o tecido adiposo coletado foi encaminhado para processamento, posterior cultura celular, quantificação e verificação da viabilidade celular.

Tabela 1 - Quantidade (g) de tecido adiposo coletado do omento maior, região perirrenal e bolsa adiposa interescapular de coelhos Nova Zelândia.

Animal/locais	Omento	Região perirrenal	Bolsa adiposa interescapular
C1 (3,67kg)	3	4	5
C2 (3,12kg)	3	4	6
C3 (3,38kg)	2	4	6

No período anterior ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e submetidos à tricotomia ampla, da cavidade abdominal e região interescapular para a realização da coleta da gordura.

A medicação pré-anestésica constituiu-se de associação de cloridrato de cetamina (20 mg kg⁻¹) e maleato de midazolam (2 mg kg⁻¹) por via intramuscular (IM). A analgesia foi realizada com cloridrato de tramadol (6 mg kg⁻¹, IM), anteriormente ao procedimento. A seguir, os animais foram encaminhados para o bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM. A indução anestésica foi realizada por meio de máscara e

vaporização com isoflurano. Já a manutenção, realizou-se com isoflurano vaporizado em 100% de O₂ ao efeito, com uso de máscara via sistema inalatório aberto, mantendo-se a respiração espontânea.

O procedimento para coleta de gordura abdominal foi realizado por meio de incisão retro-umbilical com bisturi, passando pelo tecido subcutâneo e chegando-se a linha Alba. A seguir, os músculos retos abdominais foram reparados com duas pinças de Allis, permitindo a incisão da linha Alba com bisturi e ampliação do acesso com tesoura de Metzenbaum. Na sequência, a partir de dissecação romba, coletou-se o tecido adiposo do omento maior e da gordura perirrenal. A sutura da linha alba foi realizada com poliglactina 910 3-0 em padrão isolado tipo Sultan, sendo o espaço subcutâneo reduzido com o mesmo material e em padrão contínuo simples. A sutura cutânea foi obtida com náilon 4-0 em padrão de Wolff. A seguir, o animal foi mudado de decúbito para o esternal, a fim de coletar-se a gordura da bolsa adiposa interescapular. O fragmento de tecido adiposo foi obtido por meio de incisão na linha média dorsal do animal, na região interescapular. Após identificação do tecido adiposo, o mesmo foi dissecado com pinças de Halsted e seccionado com tesoura de Metzenbaum. O espaço subcutâneo foi reduzido com fio absorvível sintético de poliglactina 910 3-0, em padrão isolado simples. Já a sutura cutânea foi obtida com mononáilon 4-0, com pontos de Wolff.

Os fragmentos de TA colhidos foram imediatamente depositados em recipientes de vidro, estéreis, contendo 150 mL de solução de Hanks (Sigma-Aldrich®) cada. Os frascos com os tecidos foram pesados ainda no interior da sala cirúrgica, identificados e encaminhados, de modo asséptico, para o Laboratório de Terapia Celular Regenerativa. Os animais utilizados foram submetidos à eutanásia após os procedimentos de coleta do tecido adiposo. A eutanásia foi realizada por meio de injeção com propofol (8mg kg⁻¹, IV) ou até a obtenção de parada cardiorespiratória.

Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica, com os materiais esterilizados por autoclavagem, radiação ou filtração. No interior de uma capela de fluxo laminar, o recipiente contendo o fragmento de TA foi aberto e, com uma pinça de dissecação, transferiu-se o tecido para uma placa de Petri. Com o auxílio de tesoura, a gordura foi seccionada várias vezes, em diversos fragmentos menores, até não ser mais possível sustentá-la com a pinça de dissecação.

Os pequenos fragmentos de TA foram lavados com solução de Hanks, utilizando-se peneira a fim de impedir a passagem dos fragmentos de gordura. A seguir, a gordura foi transferida para tubos Falcon de 50 mL e, adicionou-se a mesma, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo II (Sigma-Aldrich®), na proporção 1:3 (volume:volume). Os tubos foram tampados e lacrados com uma película semi-transparente e encaminhados para o banho-maria. Estes permaneceram no banho-maria a uma temperatura de 37°C e eram agitados manualmente, a cada cinco minutos. Nestas condições, a colagenase promovia a digestão do colágeno, permitindo que diversos tipos celulares fossem liberados do tecido, condição que gerava aspecto leitoso após, aproximadamente, 25 minutos. Passado este período, os tubos foram retirados do banho-maria e encaminhados novamente para a capela de fluxo laminar. Dada a citotoxicidade da colagenase, a mesma era neutralizada através da adição de meio completo, em um volume de 1:1.

A seguir, os tubos com o TA e o meio completo eram centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Na sequência, realizou-se agitação manual vigorosa dos tubos, objetivando-se romper os adipócitos e promover a liberação de maior número de células mononucleares. Após, os tubos foram recolocados na centrífuga, por mais cinco minutos, com a mesma rotação.

O sobrenadante foi descartado e a fração lavada com meio completo DMEM (Sigma-Aldrich®) e centrifugada, desta vez, a 440 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante, contendo a fração adipocitária, foi

desprezado, e o botão celular, contendo a fração vascular estromal (FVE), ressuspensionado em DMEM (Sigma-Aldrich®) contendo 10% de SFB. A seguir, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura primária de 75cm², com DMEM e 10% de SFB. As garrafas foram então encaminhadas para estufa a 37°C, com concentração de 5% de dióxido de carbono, local em que permaneceram a fim de se expandirem (Figura 1), sendo a troca do meio realizada após 48 horas.

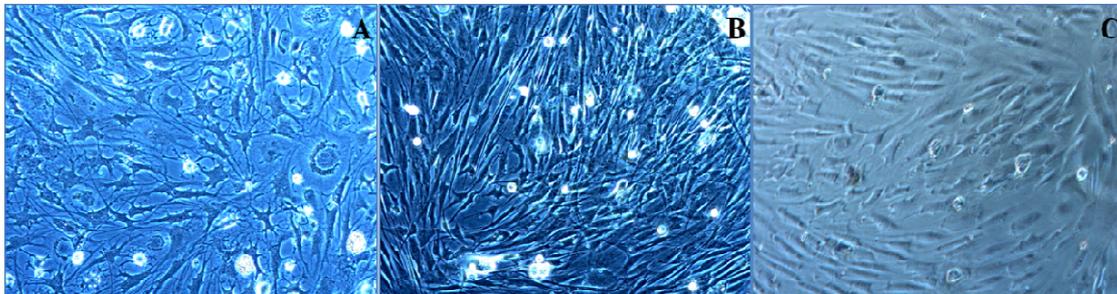


Figura 1. CTMs derivadas do tecido adiposo do omento maior (A), região perirrenal (B) e bolsa adiposa interescapular (C) de coelhos Nova Zelândia, durante o período de expansão a 37°C em CO₂.

As células foram submetidas a cinco passagens, uma a cada sete dias, sendo em cada uma, realizada a quantificação e análise da viabilidade. A contagem das células foi realizada na Câmara de Neubauer nos quadrantes laterais, de acordo com a somatória do número celular em cada quadrante. Posteriormente, foi multiplicada por 10⁴ obtendo assim o número exato de células. Procedeu-se então a coloração destas células com o corante *Trian Blue* a fim de verificar quanto a vitalidade. Na oportunidade, pela observação das garrafas de cultivo, verificou-se a viabilidade celular, bem como a presença de contaminação por fungos ou bactérias.

As células da terceira passagem, em suspensão, foram fixadas em 4% de PFA em PBS por 20 minutos. Sequencialmente, as amostras foram incubadas em PBS contendo 3% de SFB para bloqueio dos sítios inespecíficos por 20 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas nessa mesma solução com os anticorpos anti-CD105 PerCPCy5.5, anti-CD90 PE, anti-CD45 FITC e anti-CD73 FITC nas diluições recomendadas pelo fabricante, a saber, 5:100, 5:100, 20:100 e 10:100, respectivamente. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e ressuspensionadas em 400mL de PBS para aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACSDiva (BD Bioscience). Foram adquiridas no mínimo 30.000 células por amostra, identificadas no *gate* do *dot-plot* do canal de dispersão frontal (FSC – *forward scatter* - fornece informações sobre o tamanho celular) versus o canal de dispersão lateral (SSC – *side scatter* - fornecem informações sobre a granulosidade). As análises foram realizadas no *software* FlowjoV10. A amostra negativa consistiu de células não expostas aos anticorpos. A partir dessa amostra traçaram-se os quadrantes onde eventos observados além do quadrante inferior esquerdo (contendo a amostra negativa) foram considerados positivos. Outros controles foram também utilizados para a compensação dos detectores do citômetro.

Todos os dados foram submetidos ao teste estatístico Shapiro-Wilk (5%), para verificação de normalidade. Utilizou-se também o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar dois a dois, as médias de grupos e passagens para as variáveis proliferação e viabilidade. Consideraram-se as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde o processo de excisão do TA das três regiões estudadas até o processamento das células, totalizando cinco passagens, não houve nenhum tipo de intercorrência como complicações trans-cirúrgicas ou contaminação das amostras por fungos e/ou bactérias. Os procedimentos para coleta de material mostraram-se rápidos e seguros, sendo que os locais também apresentaram fácil acesso para remoção da gordura. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Ribeiro et al. (12), que estudaram CTMs derivadas do TA em equinos. Estes autores relatam que não houve necessidade de tranquilização, mas os animais permaneceram em tronco de contenção durante o procedimento para garantir a segurança do pesquisador, e que a anestesia local foi suficiente para impedir qualquer estímulo doloroso. Para os autores, o uso do cloridrato de lidocaína com vasoconstritor foi importante para minimizar o sangramento durante a coleta, evitando contaminação da amostra. No presente estudo, os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória já que o procedimento de coleta foi de maior porte, envolvendo celiotomia e manipulação visceral abdominal.

A quantidade de material coletado foi variável entre os animais, conforme já descrito na tabela 1. Retirou-se em média 2,66 g de omento maior, 4 g de tecido adiposo da região perirrenal e 5,66 g da bolsa adiposa interescapular. Essa variação ocorreu, pois na região escapular existe uma quantidade bem maior de tecido adiposo do que nas outras regiões coletadas. Ribeiro et al. (12) também relataram diferenças nas quantidades de tecido excisadas de cada animal quando trabalharam com equinos, coletando em média 13,44 g de tecido por animal. No presente trabalho, a quantidade coletada de cada região foi suficiente para isolar e cultivar apropriadamente as CTMs.

Heimburg et al. (13) comparam o rendimento de pré-adipócitos excisados ou aspirados de tecido adiposo humano e verificaram que o material lipoaspirado apresenta rendimento maior que o excisado, provando que a sucção não danifica a fração de células do estroma do tecido adiposo. Em nosso estudo, verificamos que a quantidade de CTM obtida a partir da excisão tecidual foi plenamente satisfatória em todos os sítios coletados, destacando o omento maior como local da maior média de rendimento celular.

A metodologia utilizada para o processamento e cultivo das amostras foi considerada simples e muito eficiente. A capacidade proliferativa das CTMs derivadas do tecido adiposo foi mantida no decorrer do tempo experimental em todas as passagens e locais estudados. A partir do método de exclusão por azul de tripan, podem-se observar maior média para o grupo omento quando comparado com os grupos perirrenal e escápula, porém, com significância estatística ($p < 0,05$) apenas entre os grupos omento e escápula ($p = 0,02344$) (Tabela 2, Figuras 3 e 4). Verificou-se que a quantidade de gordura omental foi a menor entre todas as fontes. Pôde-se observar também que houve queda na proliferação entre as passagens 1 e 2, seguida de recuperação nas passagens subsequentes. Outros pesquisadores (5), em seus estudos com MSCs derivadas do tecido adiposo de humanos, também observaram recuperação acentuada na proliferação celular entre a terceira e sexta passagens. Em relação a média de quantidade nossos resultados superam os encontrados por Patricio (14), que utilizou células derivadas do tecido adiposo subcutâneo de cães. Na oportunidade a autora obteve uma média de 146.803 cél/g de tecido, bem inferior a desta pesquisa, que foi de 892.182 cél/g de tecido. Segundo Neupane et al. (15), diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, tem-se mais sucesso no isolamento de CTMs com tecido adiposo subcutâneo, comparado com tecido do omento e de depósitos inguinais.

Tabela 2. Médias de proliferação (Prol.) por grama tecido adiposo e viabilidade (Viab.) (%), com seus respectivos desvios padrão, das CTMs derivadas do tecido adiposo coletadas do omento maior, região perirrenal e bolsa adiposa interescapular em coelhos ($p < 0,05$).

Locais/médias	Médias Prol.	Desvio Padrão	Médias Viab.(%)	Desvio Padrão
Omento	1.423.372 a	1.463.467,2	94,27	0,07
Perirrenal	751.335 ab	504.370,5	92,89	0,11
Escápula	501.840 b	302.523,9	95,28	0,06

*Letras diferentes em mesma coluna demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

A proliferação (cél/g de tecido adiposo) variou entre os locais durante as cinco passagens. Nas CTMs coletadas do omento e região perirrenal foi observada maior expansão na primeira passagem. Já as coletadas da bolsa adiposa interescapular tiveram sua máxima proliferação na quarta passagem (Figura 2). Kern et al. (5) em seus estudos encontraram máxima expansão na oitava passagem. Os dados diferem nos dois experimentos, porém, na presente pesquisa foram realizadas apenas cinco passagens e não nove, como verificado nos trabalhos dos autores citados acima.

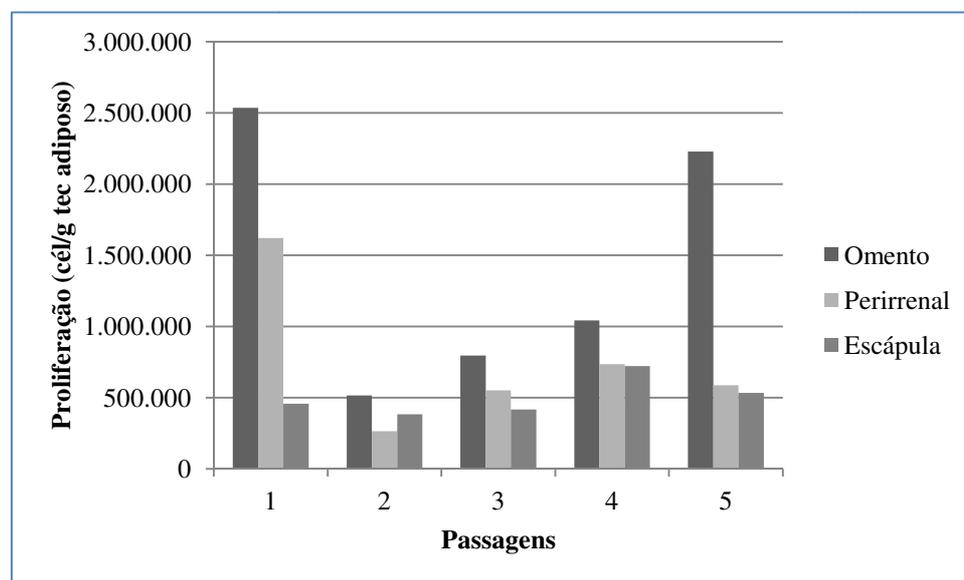


Figura 2. Gráfico demonstrando as médias de proliferação das CTMs (células/g de tecido) dos locais coletados. Observar que as células obtidas de tecido adiposo coletado do omento maior de coelhos Nova Zelândia apresentaram maior proliferação em todas as passagens.

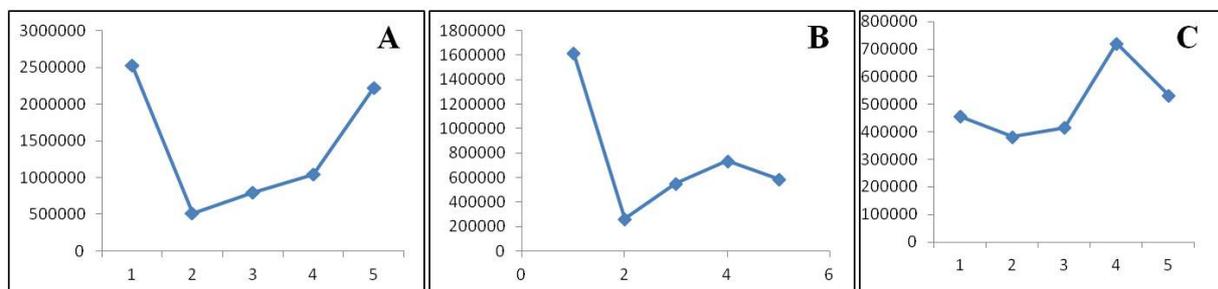


Figura 3. Gráficos lineares demonstrando a média de proliferação das CTMs (células/g de tecido) de cada local coletado. Para as células do omento (A) e gordura perirrenal (B) ocorre uma queda acentuada na segunda passagem e uma recuperação nas demais. Observar que a recuperação do omento é melhor do que a da perirrenal. Nas células da bolsa adiposa interescapular (C) a tendência é linear, ou seja, independente da passagem, o número de células por grama se mantém.

As médias de viabilidade celular entre os tecidos estudados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, embora as células derivadas da bolsa adiposa interescapular tenham se mostrado levemente superiores as do omento maior e região perirrenal, sendo que todas se mantiveram acima dos 92% (Tabela 2). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Heimbürg et al. (13), que também obtiveram média de viabilidade alta (94%) nas culturas de pré-adipócitos humanos obtidas de tecido adiposo excisado ou lipoaspirado. Ribeiro et al. (12), após processamento de células derivadas de tecido adiposo da região glútea de equinos obtiveram viabilidade de 96%. Treichel (16) estudando CTMs do tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia obteve média de viabilidade de 99,8% nas passagens iniciais, porém, não menor que 92% no restante das passagens. No presente estudo, pode-se observar ligeira queda da viabilidade nas células derivadas da região perirrenal, sendo que esta na quinta passagem apresentou-se como a menor viabilidade entre todas (81,24%) (Tabela 3). Esse dado encontrado foi semelhante ao encontrado por Maciel (17), estudando células do tecido adiposo de gatos, que chegou a verificar percentual de viabilidade de 73% na quinta passagem, com média de 81,8% entre suas amostras. Esse fato pode ser explicado talvez pelo processo natural de senescência (envelhecimento celular) ocorrido com as CTMs deste local, indicado pela baixa taxa de proliferação e viabilidade da cultura após algumas passagens. Observou-se que algumas células já apresentavam na quarta passagem morfologia indicativa de processo de envelhecimento.

Tabela 3. Viabilidade celular (%) das CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia nas cinco passagens realizadas, de acordo com cada local coletado.

Passagens/locais	Omento	Perirrenal	Escápula
P1	99,37% a	99,32% a	97,08% ab
P2	95,73% ab	95,68% ab	98,75% a
P3	98,59% a	97,00% ab	99,45% a
P4	83,67% b	91,23% b	87,66% b
P5	93,99% ab	81,24% b	93,46% ab

A citometria de fluxo revelou que, quando avaliados juntamente os CDs positivos 90 e 105 e o negativo CD45, 62,7% das células mostraram-se positivas para as duas primeiras proteínas de superfície e negativas para a última, conforme esperado quando se fala em CTM; também foi verificada positividade de 60,5% das células par o CD73 (Figura 4). Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de MSC, a International Society for Cellular Therapy concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoiéticos (CD45, por exemplo), é suficiente para a imunofenotipagem dessas células (3), conforme ocorrido neste estudo. A citometria de fluxo revelou que há reação cruzada entre humanos e coelhos, conforme também verificado no estudo de Carvalho et al. (18), utilizando ADSCs de equinos. Por problemas técnicos no laboratório não foi possível a realização da diferenciação nas três linhagens citadas pela literatura.

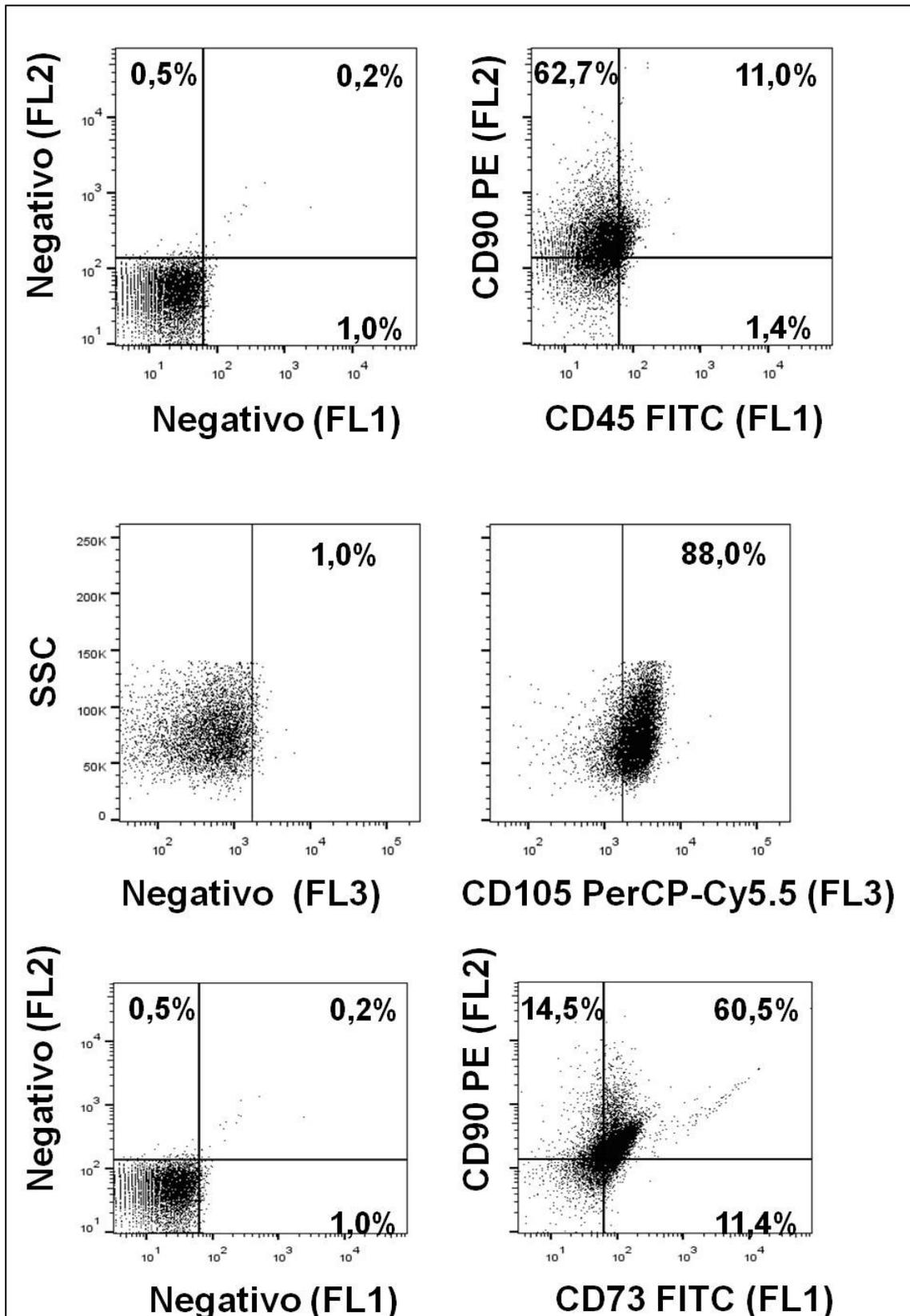


Figura 4. Citometria de fluxo das CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia. Observar positividade para os CDs 73, 90 e 105 e negatividade para o CD45.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados neste estudo, concluí-se que existe variação na capacidade proliferativa das CTMs em relação às regiões estudadas, com vantagem estatisticamente significativa da gordura omental sobre a derivada da escápula. A viabilidade das CTMs apresenta variações durante as diferentes passagens.

COMISSÃO DE ÉTICA

Este projeto foi submetido e aprovado em 10 de setembro de 2012 pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, sob parecer nº 060/2012.

REFERÊNCIAS

1. Smedo P, Costa MC, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, Shimizu MHM, Seguro AC, et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. *Einstein*. 2009;7(4):469-79.
2. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
3. Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Cienc Rural*. 2010;40(1):238-45.
4. Pinto Filho STL, Treichel TLE, Aramburu Jr JS, Rosa MB, Dalmolin F, Brun MV, et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Vet Zoot*. 2013;20:49-59.
5. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
6. Pereira ISO, Pontes P, Eça LP, Ferreira AT, Mazzetti PMV, Silva L, et al. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. *Acta ORL*. 2008;26(3):11-6.
7. Torres FC. Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
8. Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280(6):E827-47.
9. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol*. 2010;85(5):647-56.
10. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006; 312(6):727-36.

11. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2521-9.
12. Ribeiro G, Massoco CO, Lacerda Neto JC. Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32 Supl 1:118-24.
13. Heimburg DV, Hemmricha K, Haydarlioglua S, Staiger H, Pallua N. Comparison of Viable Cell Yield from Excised versus Aspirated Adipose Tissue. *Cells Tissues Organs.* 2004; 178(2):87-92.
14. Patricio LFL. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
15. Neupane M, Chang CC, Kiupel M, Gurkan VY. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(6):1007-15.
16. Treichel TLE. Contribuições para o uso de células estromais mesenquimais no reparo de feridas cutâneas e no transplante de pele em coelhos [tese]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2014.
17. Maciel BB. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
18. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Jorge LL, Conceição ML, et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2013;65(4):939-45.

Recebido em: 27/08/2014

Aceito em: 07/10/2015