Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
ISSN: 0325-2957
actabioq@fbpba.org.ar
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Nunes Alves de Oliveira, Benito Juarez; Souza, Luiz Augusto de; Eurides, Duvaldo; Franco da Silva, Luiz Antônio; Baungarten, Letícia Binda; Araújo Busnardo, Camila

Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejos

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 45, núm. 1, marzo, 2011, pp. 113-118
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53519965007

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org
Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejos

Isolation, viability and yield of rabbits' bone marrow mononuclear cells

Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira[1], Luiz Augusto de Souza[1], Duvaldo Eurides[2], Luiz Antônio Franco da Silva[3], Letícia Binda Baungarten[4], Camila Araújo Busnardo[4]

1. Alumno de doctorado del Programa de Posgrado en Ciencia Animal. Escuela de Veterinaria. Universidad Federal de Goiás, EV/UFG, Goiânia, Brasil.
2. Doctor. Profesor Titular. Universidad Federal de Uberlândia, FAMEV/UFU, Minas Gerais, Brasil.
3. Doctor. Profesor Asociado. EV/UFG, Goiânia, Brasil.
4. Médica Veterinaria. Posgrado en Ciências Veterinárias. FAMEV/UFU, Minas Gerais, Brasil.

Resumen

El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de aislamiento celular y evaluar el rendimiento y la viabilidad de células mononucleares de la médula ósea de conejos. Fueron usados 32 conejos adultos, machos, de la raza Nueva Zelanda, con peso medio de 3,06±0,24 kg. Se aspiró un volumen de 2,0 mL de la médula ósea del húmero en cada animal. Las muestras fueron diluidas en solución salina tamponada de Dulbecco (DPBS) y sometidas al gradiente de densidad Ficoll-Ipaque (1,077 g/mL) en proporción 2:1. En seguida, el material fue centrifugado a 495g por 30 minutos a 15 °C. El rendimiento y la viabilidad fueron determinados por lectura en una cámara hemocitométrica de Neubauer, utilizando el colorante de exclusión vital azul de tripan. Se obtuvo un rendimiento medio [±DE] de 6,65 [±4,18] x10^6 células/mL y una viabilidad media [±DE] de 92,66 [±4,35] %. El protocolo que utilizó el gradiente de densidad fue efectivo para el aislamiento, rendimiento y viabilidad de células mononucleares de la médula ósea de conejos para posterior utilización en terapia celular.

Palabras clave: células madre mesenquimales * médula ósea * aislamiento * conejos

Summary

The aim of this study was to establish a cellular isolation protocol and evaluate the yield and viability of bone marrow mononuclear cells in rabbits. Thirty-two male adult New Zealand rabbits were used with 3.06 ± 0.24 Kg mean weight. A volume of 2.0 mL bone marrow was aspirated from the humerus of each animal. Samples were diluted in Dulbecco phosphate buffered saline (DPBS) and submitted to density gradient using Ficoll-Ipaque (1.077 g/mL) at a 2:1 rate. Subsequently, the material was centrifuged at 495g during 30 minutes, at 15 °C. The yield and cell viability were determined

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstract Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.
ISSN 0325-2957
ISSN 1851-6114 en línea
ISSN 1852-396X (CD-ROM)

in Neubauer haemocytometer chamber, using trypan blue vital staining. A mean yield [±SD] of 6.65 [±4.18] x10^6 cells/mL was obtained and the mean viability [±SD] was 92.66 [±4.35] %. The protocol using density gradient was effective for the isolation, yield and viability of bone marrow mononuclear cells in rabbits in order to use them in cell therapy.

Key words: mesenchymal stem cells * bone marrow * isolation * rabbits

Introducción

La existencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea fue sugerida inicialmente por Cohnheim, hace más de 130 años. Sin embargo, esa hipótesis fue comprobada en 1974 con los hallazgos de Friedenstein *et al.* y el descubrimiento de las células madre mesenquimales (CMM) (1).

Las CMM de la médula ósea tienen la capacidad de renovarse y diferenciarse en varios linajes de tejidos, como conjuntivo, óseo, cartilaginoso, adiposo, tendinoso y muscular (2). Estas células han demonstrado ser una fuente celular atractiva para la reparación tisular, debido a la facilidad de su aislamiento y expansión de aspirados de médula ósea en adultos, así como por su versatilidad en la diferenciación pluripotente en tejidos mesenquimales (3).

Los aspirados de médula ósea contienen CMM y células ya diferenciadas en linajes condrogénicos y osteogénicos, como también algunas proteínas bioactivas que estimulan la regeneración ósea (4). Las CMM han sido aisladas de la médula ósea de varios animales, incluyendo roedores (1)(5)(6), gatos (7), perros (8), cerdos (9) y también de humanos (10).

Diferentes protocolos de aislamiento y cultivo de CMM fueron usados con éxito en la terapia de tejidos óseos y cartilaginosos en conejos (11-14), pero no hay muchos estudios sobre la descripción de las diferentes técnicas de aislamiento celular. Este estudio tuvo el objetivo de establecer un protocolo de aislamiento, rendimiento y viabilidad de células mononucleares de médula ósea en conejos y comparar éste con otros protocolos encontrados en la literatura.

Materiales y Métodos

Fueron utilizados 32 conejos adultos, machos, de la raza Nueva Zelanda, con peso medio de 3,06±0,24 kg, provenientes del Laboratório Vallée de Uberlândia, Brasil, para recolección de médula ósea del húmero. Los conejos fueron alojados en jaulas individuales y recibieron diariamente alimento concentrado comercial y agua *ad libitum*.

Antes del procedimiento los conejos permanecieron en ayuno hídrico y alimentario por 4 y 8 horas, respectivamente. Los animales fueron premedicados con cetamina 30 mg/kg (Agener, São Paulo, Brasil) y xilacina 5 mg/kg (Agener, São Paulo, Brasil). La manutención anestésica fue realizada con halotano (Cristália, Itapira, Brasil), usando como diluyente oxígeno al 100% administrado por medio de un circuito anestésico semicerrado.

Se depiló la piel de la región de la articulación escapulohumeral y se realizó la antisepsia con yodo detergente, alcohol y povidona yodada (Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil). Para la recolección de la médula ósea, se introdujo una aguja metálica de Rosenthal en la región del tubérculo humeral, siendo aspirados 2,0 mL de medula ósea con una jeringa de 10 mL, en la que previamente se había colocado solución salina al 0,9% heparinizada (5 U/mL). Las muestras fueron inmediatamente enviadas al Laboratorio de Inmunología de la Universidad para aislamiento, recuento y viabilidad de las células mononucleares.

Los aspirados de médula ósea se colocadon individualmente en tubos estériles de 15 mL (tipo Falcon) y se diluyeron (v/v) en solución salina tamponada de Dulbecco (DPBS, Invitrogen, São Paulo, Brasil). Después se ubicaron lentamente sobre el gradiente de densidad Ficoll-Ipaque Plus (Amersham, São Paulo, Brasil) para separación de las células en la densidad 1,077g/mL y proporción de 2:1 (médula ósea: gradiente) (15). Luego de la centrifugación a 495 *g* por 30 min a 15 ºC, se removió el sobrenadante y el anillo celular formado sobre la solución de Ficoll fue cuidadosamente colectado mediante una pipeta Pasteur y se transfirió a tubos estériles de 15 mL. El sedimento celular se lavó con 10 mL de DPBS a 493 *g*, durante 10 min a 4 ºC.

Después de descartar el sobrenadante, la suspensión celular se trató con 1,0 mL de tampón de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio 0,16 M + Tris 0,17 M, pH 7,6) durante cinco min a temperatura ambiente. Se realizó un segundo lavado con la adición de 10 mL de DPBS y el sedimento celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen, São Paulo, Brasil), con baja concentración de glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). La adición de medio DMEM fue realizada para facilitar el recuento en cámara y mantener la viabilidad celular. La

suspensión celular fue mantenida en baño de hielo hasta el momento del recuento de células y el análisis de la viabilidad.

Una alícuota de 10 µL de la suspensión celular fue adicionada a 10 µL del colorante azul de tripan para recuento de las células en una cámara hemocitométrica de Neubauer. La lectura de las células viables y no viables fue realizada por microscopia de luz y el cálculo del número de células/mL fue determinado por la siguiente fórmula: V x FN x FT/#Q, en la cual: V= número de células viables contadas; FN = factor de la cámara de Neubauer (10^4); FT = factor de dilución del azul de tripan y #Q = número de cuadrantes de la cámara utilizados para el recuento.

La viabilidad se determinó por la técnica de exclusión vital, o sea, exclusión de las células no teñidas por el azul de tripan, como anteriormente se describió (6) (16). La viabilidad celular se expresó como porcentaje aplicando la ecuación: V x 100/NT, en la que: NT = número total de células (viables y no viables) contadas en la cámara.

Resultados

En este estudio, el gradiente Ficoll-Ipaque utilizado en proporción 2:1 y con centrifugación a 495 *g* durante 30 min a 15 ºC demostró eficacia en el aislamiento de las células mononucleares a partir de un volumen de 2 mL de aspirados de médula ósea de conejos, como fue comprobado por la visualización del anillo celular (Fig. 1).

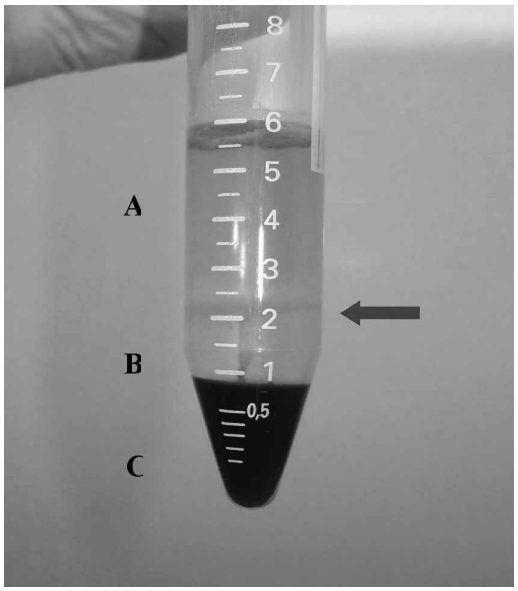

Figura 1. *Muestra de aspirado de médula ósea de conejos después de la separación por gradiente de densidad Ficoll-Ipaque. Notar el anillo celular (flecha) situado entre el plasma (A) y el gradiente (B). Sedimento de eritrocitos y polimorfonucleares (C).*

Tanto el recuento como la determinación de la viabilidad celular fueron facilitados por la utilización previa del tampón de lisis de eritrocitos, lo que favoreció la identificación de células viables e inviables (citoplasma coloreado por el azul de tripan) y la evaluación de las características morfológicas de las células presentes en las muestras (Fig. 2).

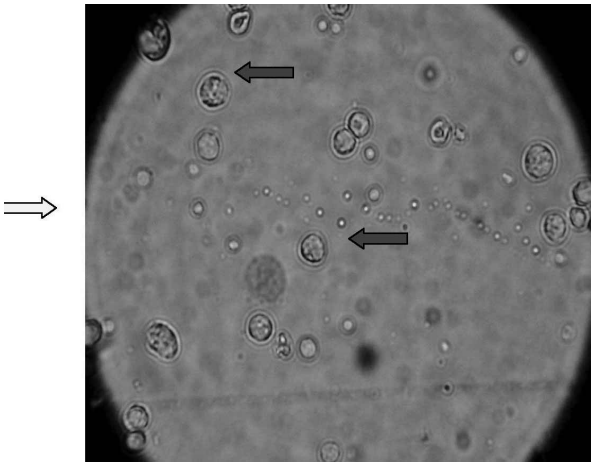

Figura 2. *Identificación de la viabilidad de células mononucleares de la médula ósea de conejos. Células viables (flechas oscuras) y células inviables con citoplasma colorado con azul de tripan (flecha clara). Microscopía de luz (aumento 100x).*

La media y la desviación estandár [±DE] de las células cuantificadas en las muestras fueron de 6,65 [±4,18] x 10^6 células/mL, variando entre 2,64 x 10^6 y 23,4 x 10^6 células/mL. La viabilidad celular analizada por el método de exclusión de células no viables varió entre 80,50% y 99%, habiéndose encontrando una media [±DE] de 92,66 [±4,35] %. Los resultados individuales de rendimiento y viabilidad celular se presentan en la Tabla I, así como también las medias y sus desviaciones estándar (Fig. 3).

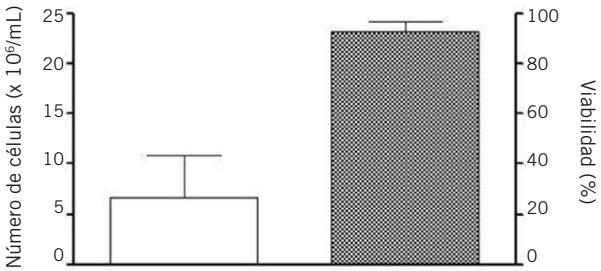

Figura 3. *Rendimiento y viabilidad de células mononucleares de médula ósea de conejos (n = 32) aisladas por gradiente de densidad (1,077 g/mL) a partir de un volumen de 2,0 mL de aspirados de médula ósea. Las barras representan la media y el desvío estándar.*

Tabla I. *Resultados individuales del recuento y viabilidad de las células mononucleares aisladas de la médula ósea de conejos.*

Animal	*Células (X10⁶/mL)*	*Viabilidad (%)*	*Animal*	*Células (X10⁶/mL)*	*Viabilidad (%)*
1	10,68	87,50	*17*	3,84	93,20
2	5,10	93,40	*18*	3,14	89,20
3	2,64	92,96	*19*	6,80	80,50
4	3,82	81,97	*20*	7,92	92,00
5	2,69	90,70	*21*	2,73	90,65
6	11,64	94,00	*22*	5,40	93,83
7	4,90	89,26	*23*	4,16	95,40
8	7,39	93,00	*24*	3,84	92,69
9	3,06	84,53	*25*	6,00	94,93
10	15,28	95,90	*26*	5,98	92,56
11	9,22	95,05	*27*	23,4	89,17
12	4,68	97,09	*28*	5,90	93,05
13	5,64	95,91	*29*	6,50	95,30
14	8,00	97,56	*30*	5,94	99,00
15	6,38	95,22	*31*	6,64	97,36
16	3,78	96,92	*32*	9,92	95,56

Discusión

El uso terapéutico de las CMM de médula ósea ha sido frecuentemente citado y puede indicarse en diversas situaciones, incluyendo disturbios cardiovasculares, tratamiento de fibrosis pulmonar, lesiones de médula espinal y regeneración de huesos y cartílagos (17). Se ha sugerido que las células de médula ósea de conejos aisladas por el gradiente de densidad Ficoll producen formación ósea superior a la producida por las células frescas de médula ósea (18). Por lo tanto, las diferencias en los protocolos de aislamiento celular y en el número de células inoculadas tienen influencia en la eficacia de la terapia (19).

En un estudio se recolectaron de 7 a 10 mL de aspirados de médula ósea de conejos y se utilizaron diferentes métodos para el aislamiento de las células mononucleares. Cuando se usó la centrifugación con gradiente Ficoll a 400 g, por 35 min, en la proporción 1:2, el recuento celular medio fue de 8 x 10^6 células/mL. Los autores concluyeron que el protocolo de centrifugación con el gradiente de densidad permitió concentrar la población de células mononucleares y favoreció la deposición de calcio "*in vitro*" en relación a otros métodos utilizados y, por consiguiente, podría favorecer la formación ósea "*in vivo*" (20).

En el protocolo de aislamiento del presente estudio se obtuvo un rendimiento medio de 6,65 x 10^6 células/mL, inferior al encontrado anteriormente (20), tal vez por haber sido aspirado un volumen inferior. Sin embargo, debe resaltarse que una cantidad suficiente de CMM para ser utilizada en terapia celular puede obtenerse a partir de volúmenes pequeños de aspirado de médula ósea, minimizando los posibles efectos adversos en el donante (21).

En un estudio realizado sobre la reparación de defectos amplios en la superfície articular de conejos, se encontró una media de 5 x 10^6 células/mL a partir de muestras de 2 mL aspiradas de la médula ósea del fémur (14). En el presente trabajo, el número medio de células fue superior al relatado por otros autores (11), que encontraron un rendimiento medio de 3,4 ± 1,5 x 10^6 células/mL aisladas de médula ósea de conejos.

Según otro trabajo (22) fueron aisladas 6 x 10^6 células/mL de aspirados de la médula ósea de ratas, semejante al recuento de células mononucleares encontradas en el presente estudio. Después de provocar una lesión osteocondral en la articulación de la rodilla de los especímenes, se inocularon 1 x 10^6 células estromales alógenas en el espacio articular. Los resultados macroscópicos e histológicos demostraron que el grupo tratado con CMM de la médula ósea presentó mejores resultados al ser comparado con los otros grupos (22). Por este motivo, se cree que la cantidad de células aisladas de las muestras en este estudio es suficiente para uso en trasplante y puede traer efectos terapéuticos benéficos para la reparación tisular.

Han sido relatados resultados superiores a 90% de viabilidad utilizando el mismo método de exclusión celular (6) (23). La viabilidad celular media verificada en este experimento fue semejante, lo que confirma la eficacia del protocolo de aislamiento adoptado. Posiblemente, la alta viabilidad se debió a la resuspensión en medio DMEM, el cual suministra los nutrientes necesarios para la manutención celular.

Una de las estrategias utilizadas en la terapia celular se basa en el principio de que debe haber una cantidad numerosa de células madre en los aspirados de médula ósea para que ese concentrado provoque efectos terapéuticos benéficos, sin que sea necesario hacer un cultivo celular (4). Por otro lado, la cantidad de CMM representa una fracción muy pequeña, aproximadamente 0,001-0,01% de la población total de células mononucleares de la médula (10). Por lo tanto, se cree que el número de células mononucleares es proporcional al volumen de médula ósea colectado. En este estudio, aunque se colectó un volumen de 2,0 mL de médula ósea, se obtuvo un rendimiento significativo de células.

Las células aisladas de médula ósea y las células mioblásticas esqueléticas han sido utilizadas en el tratamiento de cardiomiopatía isquémica en ratas, en las cuales se comprobó que el tratamiento fue efectivo cuando la dosis del inóculo varió entre 2,5 y 7,5 x 10^6 células (24). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en el tratamiento con inyección intracoronaria de células mononucleares a la dosis de 6,8 x 10^7 células, aunque se haya obtenido una viabilidad de alrededor de 95% (19).

Se sabe que el microambiente en el que esas células serán transplantadas emite señales endógenas que direccionan las células madre a que proliferen y se diferencien en linajes fenotípicos específicos. Cuando ese ambiente no es adecuado para el desarrollo celular, la terapia puede tornarse ineficiente (4). Además del microambiente y de la cantidad de células a ser transplantadas, se resalta también la importancia de correlacionar la terapia celular con la enfermedad que se quiere tratar y con las variaciones individuales de cada organismo. Otros estudios deben ser realizados sobre la determinación de la cantidad de células a ser transplantadas, buscando el éxito de la terapia celular en afecciones específicas.

Conclusión

El protocolo en el que se utilizó el gradiente de densidad Ficoll en la proporción de 2:1, con centrifugación a 495 g, durante 30 minutos, a 15 ºC, fue efectivo para el aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejos, para uso posterior en reparación tisular.

AGRADECIMIENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico – CNPq.
Laboratório Vallée de Uberlândia - Minas Gerais, Brasil.
Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno -
Traducción (EV/UFG, Brasil).

CORRESPONDENCIA

DR. BENITO JUAREZ NUNES ALVES DE OLIVEIRA
Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária
Rodovia Goiânia - Nova Veneza Km 0
Campus II - Samambaia
74001-970 - Goiânia, GO - Brasil - Caixa-Postal: 131
Telefone: (62) 3521-1595
e-mail: benito@ortoneurovet.com

Referencias bibliográficas

1. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, *et al*. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. Exp Hematol 1974; 2 (2): 83-92.
2. Campagnoli C, Roberts AG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98 (8): 2396-402.
3. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue-engineering aplications: current status and future prospects. Tissue Eng 2005; 11 (5-6): 787-802.
4. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. Vet Surg 2006; 35 (3): 232-42.
5. Simmons DJ, Seitz P, Kidder L, Klein GL, Waeltz M, Gundberg CM, *et al*. Partial characterization of rat marrow stromal cells. Calcif Tissue Int 1991; 48 (5): 326-34.
6. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE, Deffune E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. Acta Ortop Bras 2006; 14 (1): 22-4.
7. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol 2002; 30 (8): 879-86.
8. Huss R, Hoy CA, Deeg HJ. Contact- and growth factor-dependent survival in a canine marrow-derived stromal cell line. Blood 1995; 85 (9): 2414-21.
9. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, *et al*. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res 2002; 307 (3): 321-7.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284 (5411): 143-7.
11. Im G, Kim D, Shin J, Hyum CW, Cho WH. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. J Bone Joint Surg 2001; 83-B (2): 289-94.
12. Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. *In vivo* bone engineering in a rabbit femur. J Craniofac Surg 2003; 14 (3): 324-32.

13. Huang C, Kristen LH, Frost LE, Sun Y, Cheung HS. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2004; 22 (3): 313-23.
14. Yanai T, Ishii T, Chang F, Ochiai N. Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit. J Bone Joint Surg 2005; 87B (5): 721-9.
15. Boyüm A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and Ficoll as erythrocyte aggregating agents. Scand J Clin Lab Invest 1968; 97 (Suppl): 31-50.
16. Fresney RI. Cultures of animal cells: a manual of basic technique. 3nd. ed. New-York: Wiley-Liss; 2001.
17. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36 (4): 568-684.
18. Budenz RW, Bernard GW. Osteogenesis and leukopoiesis within diffusion-chamber method as a quantitative assay for osteogenesis. Am J Anat 1980; 159 (4): 455-74.
19. Lunde K, Solheim S, Aukhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, *et al*. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. N Eng J Med 2006; 355 (12): 1199-209.
20. Connolly JF, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. J Bone Joint Surg Am 1989; 71A (5): 684-91.
21. Eurides D, Oliveira BJNA, Souza, LA, Silva LAF, Daleck CR, Freitas PMC. Obtenção de células da medula óssea pela punção do tubérculo umeral de coelhos. ARS Veterinária 2010; 26 (5): 60-4.
22. Nishimori M, Deie M, Kanaya A, Exham H, Adachi N, Ochi M. Repair of chronic osteochondral defects in the rat: a bone marrow-stimulating procedure enhanced by culture allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. J Bone Joint Surg 2006; 88B (9): 1236-44.
23. Tognoli GK, Pippi NL, Olsson DC, Graça DL, Traezel CK, Lopes STA, *et al*. Isolamento, quantificação e viabilidade da fração total de células mononucleares da medula óssea em cães. Acta Scient Veter 2007; 35 (2): 368-9.
24. Brofman PRS, Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto CL, Senegagila AC, Furuta M, *et al.* Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. Arq Bras Cardiol 2004; 83 (4): 294-2.

Aceptado para su publicación el 12 de noviembre de 2010