



CÉLULAS-TRONCO EM PEQUENOS ANIMAIS

Érica de Souza Viscondi¹, Fernanda Gosuen Gonçalves Dias², Thiago André Salvitti de Sá Rocha³, Lucas de Freitas Pereira⁴, Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias⁵

¹ Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

² Mestre em Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Especialista em Odontologia Veterinária, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

³ Médico Veterinário, Residência na FCAV/UNESP – Jaboticabal, São Paulo, Brasil

⁴ Mestre em Medicina Veterinária, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

⁵ Prof. Dr. do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Animais, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil
e-mail do autor: gustavogosuen@gmail.com

Recebido em: 06/05/2013 – Aprovado em: 17/06/2013 – Publicado em: 01/07/2013

RESUMO

As células-tronco são células de regeneração e proliferação que ficam latentes no organismo e se expressam diferentemente de acordo com a resposta a inúmeros estímulos. Podem ser encontradas durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos. Recentes descobertas revolucionaram a biologia das células-tronco e demonstraram o potencial clínico das mesmas diante da variedade de afecções que atingem os animais de companhia, proporcionando assim melhor qualidade de vida e sobrevida aos pacientes acometidos. A presente revisão bibliográfica objetivou discorrer sobre a origem, diferentes formas, locais e materiais de coleta nos animais de pequeno porte, métodos de preparo, cultivo, diferenciação, armazenamento e utilização das células-tronco na terapia celular. Não obstante, este estudo abordará a pesquisa de células-tronco em animais como modelo para futuras investigações em seres humanos, também no intuito de se tornar mais uma vertente terapêutica na resolução e/ou melhoria no prognóstico de enfermidades ou disfunções orgânicas de difícil resolução.

PALAVRAS-CHAVE: cão, gato, medula óssea, terapia celular

STEM CELLS IN SMALL ANIMALS

ABSTRACT

Stem cells are cells regeneration and proliferation that lie dormant in the body and are expressed differently according to the response to numerous stimuli. Can be found during embryonic development and in adult tissues. Recent discoveries have revolutionized biology of stem cells and demonstrated the clinical potential of facing the same variety of diseases affecting companion animals, thus providing a better quality of life and survival of patients affected. This literature review aims to discuss the origin, different shapes, locations and collection materials in small animals,

methods of preparation, cultivation, differentiation, storage and use of stem cells in cell therapy. Nevertheless, this study will address the research of stem cells in animals as a model for future investigations in humans, also in order to become more of a part in solving therapy and / or improvement in the prognosis of disease or organ dysfunction difficult to resolve.

KEYWORDS: dog, cat, bone marrow, cell therapy

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A melhoria na qualidade de vida dos pequenos animais tem gerado aumento da idade média dos mesmos, o que também acarreta maior incidência de doenças sistêmicas. Diante disso, novas alternativas terapêuticas como a terapia celular visam restaurar a funcionalidade de organismos previamente acometidos (CARLO et al., 2003; OLIVEIRA, 2008; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011).

As células-tronco (CT) também conhecidas como células primordiais, células-mãe e “stem cells” (DEL CARLO, 2005; SOARES et al., 2007; HAMZÉ et al., 2009) são indiferenciadas e com características multipotentes (SANTOS et al., 2004; KRAUS & KIRKER-HEAD, 2006; ZAMPROGNO, 2007; CASTRO-SILVA et al., 2010; COLOMÉ et al., 2008). Atualmente, estão sendo alvo de interesse na terapia celular, com perspectivas inovadoras, por possuírem alta capacidade de autorenovação, autoproliferação, diferenciação em linhagens celulares especializadas (DEL CARLO, 2005; ASSIS et al., 2007; SOARES et al., 2007; COLOMÉ et al., 2008; HAMZÉ et al., 2009) e regeneração tecidual (DEL CARLO, 2005; OLIVEIRA, 2008; HAMZÉ et al., 2009) após a ocorrência de fatores estimulantes diversos (traumatismos, fraturas, inflamações, necroses e neoplasias nos órgãos e tecidos e perdas por senilidade) (NAKAGE et al., 2009; LIMA et al., 2012). De acordo com OLIVEIRA (2008), as CT permanecem quiescentes no seu habitat, até que sejam ativadas por tais estímulos.

Pela alta capacidade de renovação e diferenciação, apresentam excelente potencial na terapia celular (DEL CARLO, 2005; SOARES et al., 2007; NAKAGE et al., 2009), a qual vem crescendo significativamente na medicina veterinária e humana (CARVALHO, 2001; COLOMÉ et al., 2008; CASTRO-SILVA et al., 2010). Para o sucesso dessa terapêutica são necessários três fatores primordiais como a presença das células-tronco, matriz extracelular que funcione como arcabouço e fatores de crescimento (DEL CARLO, 2005; SOARES et al., 2007; LIMA et al., 2012). Uma explicação relevante para a regeneração de tecidos após aplicação das células-tronco é a liberação de citocinas e fatores tróficos no local lesionado (OLIVEIRA, 2008).

As células-tronco são classificadas em embriogênicas (encontradas no embrião) ou somáticas (presentes em tecidos fetais desenvolvidos, recém-nascidos ou em adultos) (SOARES et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; HAMZÉ et al., 2009). As CT podem ser isoladas do baço, timo, placenta, tecidos fetais, vasos sanguíneos, sangue do cordão umbilical, cartilagem, periósteo, sinóvia, líquido sinovial, músculos e tendões, porém a medula óssea é o local de eleição para o isolamento, por ser de fácil acesso e possuir grande quantidade celular (CARVALHO, 2001; BITTENCOURT et al., 2006; NAKAGE & SANTANA, 2006; COLOMÉ et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

A medula óssea possui duas distintas linhagens: células progenitoras

hematopoiéticas e mesenquimais (CARVALHO, 2001; NAKAGE & SANTANA, 2006; OLIVEIRA, 2008; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011). As primeiras dão origem às células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) (CASTANIA, 2007), podendo ser utilizadas clinicamente no restabelecimento dos elementos sanguíneos e do sistema imunológico (PEREIRA et al., 2008). As mesenquimais (células-tronco adultas) podem originar células musculares, tecido adiposo, hepatócitos, osteócito, condrócitos e estroma (DEL CARLO, 2005; CASTRO-SILVA et al., 2010), o que demonstra sua alta plasticidade (CASTANIA, 2007; SOARES et al., 2007; PEREIRA et al., 2008).

As hematopoiéticas podem ser facilmente identificadas e quantificadas, pois expressam uma glicoproteína de membrana (o antígeno CD34) (NAKAGE & SANTANA, 2006; OLIVEIRA, 2008; NAKAGE et al., 2009; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011), já o fenótipo antigênico das mesenquimais não é único, ou seja, não possuem nenhum marcador de superfície, pois exibem morfologia fibroblastoide inespecífica (HANS et al., 2005; LIMA et al., 2012), permitindo sua identificação somente por cultura celular (CASTRO-SILVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

As mesenquimais, por possuírem alto poder de renovação e diferenciação em linhagens de tecido conjuntivo, tornaram-se alvo promissor de pesquisa na medicina regenerativa (KRAUS & KIRKER-HEAD, 2006; NAKAGE et al., 2009), a qual objetiva-se a recuperação de órgãos e tecidos lesados, pela introdução de novas células diferenciadas nesses locais comprometidos, restabelecendo a função previamente perdida (CARLO et al., 2003; NAKAGE & SANTANA, 2006; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011). Deste modo, surgiu uma nova possibilidade no tratamento de afecções congênitas, degenerativas, vasculares, traumáticas e iatrogênicas (CARLO et al., 2003; HANS et al., 2005; OLIVEIRA, 2008; HAMZÉ et al., 2009). Esse tipo celular está sendo largamente utilizado em pesquisas por não apresentarem barreiras éticas, pela facilidade de obtenção e ainda por serem usadas em transplantes autólogos (ZAMPROGNO, 2007). Sob a ação de estímulos, pode se diferenciar em tecidos especializados como osso, músculo, cartilagem, tendão, ligamento e entre outros (CARLO et al., 2003; DEL CARLO, 2005; CASTRO-SILVA et al., 2010; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011), apontando também possibilidades de melhora na qualidade de processos regenerativos (KRAUS & KIRKER-HEAD, 2006; NAKAGE & SANTANA, 2006). Por outro lado, a utilização de células-tronco embrionárias origina sérias questões biológicas, éticas e legais limitando o seu uso em experimentos (SANTOS et al., 2004; COLOMÉ et al., 2008).

Os pontos positivos a serem abordados no uso de células-tronco como terapia celular é a menor probabilidade de rejeição imunológica (pela superioridade de enxertos autógenos e as limitações de enxertos alógenos, xenógenos e aloplásticos) e a não necessidade de estoque celular em bancos de tecidos, pois são aparentemente inesgotáveis (BRUNO et al., 2001; SOUZA et al., 2005; CASTRO-SILVA et al., 2010).

No entanto, a vantagem mais óbvia no uso de CT é a simplicidade do procedimento em que células extraídas da medula óssea podem ser imediatamente introduzidas no sítio receptor. Esta técnica é a mais usada, não somente pelo baixo custo e não requer instrumentação extra, mas também por ser considerada não invasiva e por requerer menor tempo cirúrgico, diminuindo os riscos anestésicos aos pacientes (ASSIS et al., 2007; PEREIRA et al., 2008).

A terapia celular e gênica tem-se mostrado muito próspera como opção de tratamento, podendo revolucionar a medicina do futuro (LEITE & DOHMANN, 2004; OLIVEIRA et al., 2010), porém apesar dos avanços no emprego das CT como

auxiliares nos tratamentos de enfermidades, muitos questionamentos ainda não foram esclarecidos, e ademais alguns resultados obtidos ainda são preliminares. O modelo canino é o mais utilizado, proporcionando informações pré-clínicas ao homem (NAKAGE & SANTANA, 2006). O uso de CT está sendo explorado nas áreas de oftalmologia, cardiologia, ortopedia, neurologia, entre outras (OLIVEIRA, 2008).

Alguns exemplos podem ser citados como o trabalho de NARAZAKI & CRISTANTE (2011), que utilizaram as células-tronco com bons resultados na ortopedia e traumatologia humana para formar tecidos ósseo, nervoso, articular e conjuntivo denso, porém em indivíduos jovens com lesões pequenas. De acordo com tais autores, a utilização dessas células para formar tecido ósseo determinará uma diminuição da morbidade na região doadora de enxerto ósseo e evita transmissão de doenças pelos enxertos homólogos. Nesta mesma área, OLIVEIRA (2008) e OLIVEIRA et al. (2010) também afirmaram que a taxa de consolidação tibial em cães (feita por análise radiográfica) foi mais rápida após o uso de CT mesenquimais.

COLOMÉ et al., (2008) afirmaram após experimentação em coelhos que o tratamento com CT também apresentou vantagens no processo de regeneração do nervo periférico tibial.

Na odontologia, CASTRO-SILVA et al., (2010) relataram que cirurgias com finalidade protética visando o ganho ósseo para posterior ancoragem de implantes osseointegráveis de titânio, têm obtido boa previsibilidade clínica utilizando enxertos associados às células-tronco mesenquimais. Ainda na área odontológica, SOARES et al., (2007) relataram que CT isoladas da polpa dentária exibiram excelente habilidade na formação de estruturas semelhantes ao complexo dentina-polpa.

CARVALHO (2001) descreveu que células-tronco também podem originar células musculares esqueléticas e podem migrar da medula óssea para regiões lesadas no músculo.

SANTOS et al., (2004) relataram que a terapia com CT poderá reparar danos causados no miocárdio pela doença de Chagas, como melhora significativa na miocardite e diminuição na fibrose, trazendo ao paciente melhor qualidade de vida e nova opção terapêutica que não seja o transplante cardíaco.

Segundo BRUNO et al., (2001), constataram que o transplante de células-tronco autógenas do limbo esclerocórneo de cães sobre lesões córneo-limbais, apresentou vantagem comparativamente aos demais, pois possibilita a melhoria da transparência corneana, sem intercorrências oculares.

Independente da pesquisa em questão, para a realização adequada dessas terapias é indispensável o conhecimento sobre o processo de coleta, cultivo e diferenciação das células-tronco (CARLO et al., 2003). No Brasil, a coleta, transporte, armazenamento, controle de qualidade e utilização de células-tronco destinadas à pesquisa humana são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (CASTRO-SILVA et al., 2010).

A coleta de medula óssea permite não só a aquisição de células-tronco para cultivo celular, mas também a realização de mielograma e biópsia medular (SOUZA et al., 2005; CASTRO-SILVA et al., 2010). O mielograma verifica a normalidade da produção sanguínea, alterações no aspecto celular e possível presença de células neoplásicas (AQUINO et al., 2002; PEREIRA et al., 2008), sendo comumente solicitado quando se encontra alterações no hemograma, tais como neutropenia persistente, trombocitopenia, leucocitose, morfologia anormal de células sanguíneas, presença inexplicável de células imaturas no sangue, anemia arregenerativa ou

combinação dessas enfermidades. A biópsia da medula óssea é também utilizada para o diagnóstico de doenças metastáticas e hematológicas (HANS et al., 2005).

Para a obtenção de células-tronco da medula óssea de cães e gatos é necessário coletas sucessivas por aspiração intraóssea com o auxílio de agulhas específicas estéreis e seringas com anticoagulante (MULLER et al., 2009; LIMA et al., 2012). As agulhas mais utilizadas na coleta são as de Silverman, Jamshidi ou de mielograma (LEITE & DOHMANN, 2004; CASTRO-SILVA et al., 2010). Quando é necessária uma quantidade maior de amostra, sugerem-se agulhas com maior calibre do que as citadas anteriormente, a fim de aumentar o volume coletado em menor tempo cirúrgico (OLIVEIRA, 2009; CASTRO-SILVA et al., 2010); para tanto, podem ser utilizadas as de Osgood, Steis ou Rosenthal. As agulhas devem ser utilizadas juntamente com o mandril, na tentativa de evitar a obstrução de sua luz por esférolas ósseas (BITTENCOURT et al., 2006; CASTRO-SILVA et al., 2010).

Mesmo apresentando diâmetro elevado em relação ao osso, essas agulhas não causam comprometimento vascular no córtex, pois não preenchem mais que 70% do canal medular (BITTENCOURT et al., 2006; CASTRO-SILVA et al., 2010).

Os locais comumente aspirados após tricotomia ampla e antisepsia são a crista ilíaca, região transilíaca, trocânter maior do fêmur, epífise proximal da tíbia e do úmero (BITTENCOURT et al., 2006; NAKAGE et al., 2009); por apresentarem quantidade suficiente de material, facilidade anatômica pela escassa musculatura local e ausência de grandes vasos que possam ser comprometidos pelo deslizamento acidental da agulha durante a aspiração (SOUZA et al., 2005; MULLER et al., 2009; CASTRO-SILVA et al., 2010).

Não há relatos que contra indiquem o procedimento, porém o animal deve estar anestesiado geral durante a coleta, com prévio jejum sólido e hídrico de doze e seis horas, respectivamente. O decúbito do animal após anestesia dependerá do sítio de coleta escolhido. Toda coleta deve ser feita de forma asséptica, sem necessidade de incisar a pele (CASTANIA, 2007).

A precisão dos movimentos de introdução da agulha no canal medular determinam a rapidez e precisão do procedimento. Sugerem-se algumas manobras que promovem a eficiência, dentre elas, a empunhadura da agulha deve ser bem apoiada pela palma da mão, para que o cirurgião consiga aplicar melhor a sua força (MULLER et al., 2009). O dedo indicador deve ser colocado na porção final da agulha e será o responsável tanto pelo movimento de pivô da mão do cirurgião, direcionando a perfuração e introdução da agulha, quanto pela limitação da introdução desta. Esse artifício oferece segurança ao procedimento, uma vez que limita eventuais perfurações indesejadas, caso haja deslizamento da agulha (CASTRO-SILVA et al., 2010).

A outra mão será utilizada para apreender e delimitar as extremidades do local a ser perfurado, garantindo, assim, que a agulha seja introduzida na região desejada do osso (MULLER et al., 2009). Para iniciar a perfuração, devem ser realizados movimentos de rotação com a mão, o pulso e o antebraço, simultaneamente, evitando a movimentação lateral da agulha. O cotovelo e o braço do cirurgião deverão permanecer imóveis, para garantir que o orifício de entrada da agulha seja o menor possível (BRUNO et al., 2001; LEITE & DOHMANN, 2004; CASTRO-SILVA et al., 2010).

Após a introdução da agulha, o mandril deve ser removido, e uma seringa contendo anticoagulante acoplada. Discreta retração do êmbolo é suficiente para obtenção de vácuo e aquisição do material (OLIVEIRA, 2008).

Dentre as eventuais complicações que podem ocorrer durante a coleta de CT

da medula óssea em pequenos animais estão as fraturas ósseas, pelos movimentos de alavanca feitos com a agulha e quando são realizadas múltiplas perfurações em uma mesma região óssea (MULLER et al., 2009; CASTRO-SILVA et al., 2010). Outra complicação poderá ocorrer quando a coleta for realizada na pelve, e a agulha deslizar no osso projetando-se para o interior da pelve, perfurando vísceras ou grandes vasos, provocando hemorragia local e ocasionando situação de emergência, colocando o paciente em riscos iminentes. Existe também o risco de contaminação do canal medular, que pode evoluir para osteomielite, mesmo tratando-se de um pequeno orifício, este se constitui porta de entrada de patógenos (AQUINO et al., 2002; CASTANIA, 2007; CASTRO-SILVA et al., 2010). Nesses casos, o tratamento requer cuidado minucioso, sendo recomendados cultura e antibiograma do material obtido do local infectado e, uso de antibioticoterapia adequada para o paciente (CASTRO-SILVA et al., 2010).

O volume ideal de medula óssea a ser colhida durante aspiração é de aproximadamente 10-15ml/kg de peso vivo do animal (OLIVEIRA, 2008; CASTRO-SILVA et al., 2010). A amostra coletada deve ser encaminhada ao laboratório em temperatura ambiente, ou ainda podem ser confeccionadas lâminas *in natura*, para serem analisadas tão logo sejam obtidas (CASTRO-SILVA et al., 2010).

As células-tronco mesenquimais representam uma pequena porção da população total de células da medula óssea (aproximadamente uma CT por 10^5 células), o que requer isolamento e expansão por cultivo (*in vitro*) para obtenção de número suficiente para uso experimental e/ou clínico (BITTENCOURT et al., 2006; NAKAGE et al., 2009).

No laboratório, toda a amostra de medula óssea deve ser fracionada em solução de gradiente de densidade. Após, as células são plaqueadas ou colocadas em frascos plásticos em densidades que variam de 1×10^4 células/cm² a $0,4 \times 10^5$ células/cm². As CT mesenquimais se aderem a tubos e frascos de cultura, ao contrário das hematopoiéticas, que não possuem essa capacidade de adesão; facilitando a seleção entre tais tipos celulares. Os outros tipos de células considerados “contaminantes” para a amostra de medula óssea (como os macrófagos) são eliminados após inúmeras culturas consecutivas (BITTENCOURT et al., 2006; CASTRO-SILVA et al., 2010).

As placas ou frascos plásticos contendo a amostra de medula óssea são cultivados em meios especiais contendo componentes como aminoácidos, sais minerais, glicose, bicarbonato de sódio, fatores de crescimento (LIMA et al., 2012) e demais substâncias como dexametasona, hidrocortisona, ácido ascórbico e indometacina (BITTENCOURT et al., 2006; MULLER et al., 2009; CASTRO-SILVA et al., 2010), que auxiliarão diretamente na quimiotaxia, diferenciação, proliferação e atividade sintética das células (OLIVEIRA et al., 2010; LIMA et al., 2012).

O material é mantido em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ para evitar alterações no pH do meio, que tende a se tornar alcalino devido à atividade metabólica das células. Após isolamento e expansão das CT mesenquimais, essas devem ser conduzidas à diferenciação em múltiplas linhagens fenotípicas (BITTENCOURT et al., 2006; CASTRO-SILVA et al., 2010). Estudos demonstraram que as células mesenquimais duplicam-se em um período de 33 horas, demonstrando grande potencial de expansão, a qual varia com as condições de cultivo (ASSIS et al., 2007; CASTRO-SILVA et al., 2010).

Em testes de histocompatibilidade e imunoensaios celulares *in vitro* utilizam-se protocolos de cultivo celular, porém outros procedimentos em geral têm sido realizados utilizando diversos gradientes de densidade de alto peso molecular.

Dentre eles estão o Ficoll-Hypaque®, Histopaque®, Isolymp® e Nycomed®, os quais apresentam a função de isolar linfócitos e células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea (ASSIS et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; NAKAGE et al., 2009).

BOYUM (1968) foi o primeiro pesquisador a descrever a técnica de isolamento de células mononucleares utilizando o Ficoll® como gradiente de densidade. Nesse estudo, o autor demonstrou que a baixa viscosidade do gradiente, comparado com outros agentes de agregação de eritrócitos, foi eficaz no isolamento *in vitro* de linfócitos do sangue periférico humano, a partir de centrifugações rápidas e de baixa velocidade.

O gradiente de densidade Ficoll® tem se destacado por ser de fácil aplicabilidade, rápido e por favorecer a concentração de células mononucleares da medula óssea, atingindo altos níveis de rendimento celular (OLIVEIRA, 2009).

O Ficoll-Paque 400® é uma solução aquosa com densidade de $1,077 \pm 0,001$ g/ml contendo 5,7g de Ficoll, 9g de diatrizoato de sódio e 0,0231g de ácido etilenodiaminotetracético para cada 100 ml. Essa composição é responsável pela formação de uma solução de baixa viscosidade e alta densidade (CARLO et al., 2003; ASSIS et al., 2007).

O princípio da técnica de separação baseia-se na densidade do gradiente em relação aos linfócitos, monócitos e plaquetas, os quais não conseguem penetrar pelo gradiente. Esses se depositam na interface entre o Ficoll® e o plasma, formando o chamado “anel celular” (ASSIS et al., 2007).

A migração celular durante o processo de centrifugação com o Ficoll® resulta na formação de camadas contendo diferentes tipos celulares. A fração celular constituída de eritrócitos e granulócitos atravessam o gradiente e sedimentam no fundo dos tubos, podendo ocorrer o aprisionamento de alguns linfócitos durante a agregação eritrocitária da medula óssea a fresco. Contudo, esse processo pode ser evitado diluindo-se inicialmente o sangue, aumentando assim o rendimento celular e reduzindo a agregação das células vermelhas (ASSIS et al., 2007).

As principais soluções para a diluição da medula óssea são a solução salina tamponada e meios de cultivo modificados, podendo este último ser suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%. A amostra de medula óssea diluída é, em seguida, depositada lentamente sobre o gradiente de densidade de separação de células (OLIVEIRA, 2009).

Outro fator a ser considerado é a temperatura de centrifugação. A agregação eritrocitária é favorecida em altas temperaturas (37°C) enquanto que em baixas (4°C), a taxa de agregação é reduzida, porém, o tempo de separação é aumentado, o qual também reduz o rendimento celular. Geralmente a temperatura de 18-20°C fornece bons resultados no processo de isolamento. Esses mesmos autores citaram também que após o processo de centrifugação, o plasma sobrenadante é desprezado utilizando-se pipeta de Pasteur e o anel celular é removido e transferido para outro tubo. Lavagens subsequentes são recomendadas com soluções salinas balanceadas, com a finalidade de remover o remanescente de plasma, plaquetas e a solução de Ficoll® (OLIVEIRA, 2009).

Os procedimentos de lavagem pelos métodos padrões de isolamento geralmente são eficientes na remoção das plaquetas. Caso as plaquetas estejam presentes, pode-se realizar a centrifugação com gradiente de sucrose a 4-20%, bem como com adenosina-5-difosfato (ADP) após a separação dos linfócitos, os quais auxiliam na remoção do remanescente. O rendimento e a diminuição da pureza dos linfócitos dependem consideravelmente da eficácia na remoção das células

vermelhas (SCHWINDT et al., 2005).

Diversos produtos comerciais estão disponíveis como a solução de lise FACS® e/ou preparadas em laboratório, como o cloreto de amônio 0,16 M em solução de Tris 0,17 M, com pH 7,6, recomendando-se diluir 1 ml ao “anel celular” isolado e manter em repouso durante cinco minutos. O tampão de lise, segundo estudos, favorece a contagem das células na câmara hemocitométrica de Neubauer, reduzindo as falhas na determinação do rendimento celular (OLIVEIRA, 2009).

Existem atualmente vários testes para a determinação da integridade celular. Um deles é o método do azul de Trypan, um corante que tem a capacidade de penetrar no interior da célula, cuja membrana esteja rompida (OLIVEIRA, 2008). Tal teste é largamente empregado devido a sua praticidade, porém possui o inconveniente de produzir artefatos na penetração do corante, comprometendo a sua determinação. Há protocolos alternativos ao azul de Trypan, como aqueles baseados na citometria de fluxo, os quais utilizam uma combinação de marcadores, como a anexina, uma proteína que possui afinidade pelos fosfolipídios expostos pela membrana celular e o corante 7-AAD, o qual penetra no interior da célula, fornecendo informações acerca da formação de poros da membrana celular (LIMA et al., 2012).

Esses métodos de determinação do rendimento e viabilidade celular precisam ser o mais confiável possível, a fim de refletirem o estado de integridade da membrana, uma vez que o sucesso de um transplante celular depende dessa integridade, a fim de que as células possam colonizar a área afetada em uma determinada lesão, interagindo com as demais células do hospedeiro e recuperando o tecido lesado (NAKAGE et al., 2009).

O cálculo da viabilidade celular é obtido contando o número de células totais da amostra e as viáveis (não coradas), seguindo a seguinte fórmula (NAKAGE et al., 2009):

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{número de células viáveis} \times 100}{\text{número de células totais}}$$

Pode ser utilizado também um contador eletrônico de células, conhecido como “cell counter”, que é um dispositivo capaz de contar e medir partículas em suspensão. Esse sistema é formado por dois eletrodos e um amplificador, os quais registram e transmitem as oscilações na resistência à passagem das células pelo orifício, armazenando e analisando os dados em seguida (NAKAGE et al., 2009).

Em vários estudos, a proporção de CT transplantadas, que foram incorporadas pelo tecido lesado e que se diferenciaram, não explica a melhora funcional observada. Assim, uma explicação pertinente para a regeneração tecidual após aplicação de CT é a liberação de citocinas e fatores tróficos no local da lesão. Como a maioria das CT é capaz de identificar e migrar até o local lesionado, pode-se concluir que estas possuem capacidade de responder a fatores quimiotáticos liberados pelo tecido lesionado (SCHWINDT et al., 2005).

Há ainda evidências de que estas células, por sua vez, podem ser capazes de liberar outras moléculas em resposta aos estímulos quimiotáticos recebidos. Tendo várias hipóteses em relação às supostas funções de tais fatores na lesão, dentre

elas; liberação de moléculas que previnem a morte celular, recrutamento de CT adjacentes do próprio tecido, interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual (modulando a resposta do sistema imune), suporte de moléculas ou enzimas que suprem defeitos metabólicos (SCHWINDT et al., 2005).

Diante da vasta utilização de células-tronco na terapia celular, o objetivo do presente trabalho foi discorrer sobre a origem, forma de coleta, métodos de preparo, armazenamento e utilização das células-tronco, visando elucidar sua importância na medicina veterinária, já que o assunto é escopo de inúmeras investigações na solução de moléstias de prognóstico desfavorável.

DISCUSSÃO

A busca por alternativas reabilitadoras minimamente invasivas, seguras e de qualidade é uma realidade, sendo testadas em pesquisas de diversos centros de bioengenharia espalhados pelo mundo (AQUINO et al., 2002; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011). As terapias celular e gênica mostram-se extremamente promissoras como vertentes de tratamento, minimizando a dor dos pacientes e a morbidade de áreas doadoras. Localiza-se aqui, a maior perspectiva de uso clínico desta moderna tecnologia, sendo opção terapêutica para o paciente portador de enfermidade até hoje sem solução. Afortunadamente, encontra-se em processo precoce de testes e pesquisas (LEITE & DOHMANN, 2004).

As pesquisas com células-tronco estão aprimorando a terapia celular. Devido às dificuldades práticas de obtenção de CT embrionárias decorrentes de aspectos éticos, morais e legais, os pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco mesenquimais, que podem ser isoladas de diferentes tecidos, mas primariamente da medula óssea e dão origem a tecidos conjuntivos, como ossos, cartilagens, gordura, bem como o sistema vascular e hematopoiético (SOARES et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011). Esse tipo celular permanece em repouso até que, a partir de um sinal ou evento no organismo, inicia a sua dupla capacidade de divisão celular e de auto-renovação (CARLO et al., 2003; DEL CARLO, 2005; ZAMPROGNO, 2007; CASTRO-SILVA et al., 2010; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011).

Em estudo utilizando células-tronco associadas a plasma rico em plaquetas no alongamento ósseo com fixador esquelético externo em seres humanos, observou-se minimização no tempo de crescimento e consolidação óssea mais rápida, diminuindo as intercorrências oriundas do longo tempo de permanência dos implantes do fixador, corroborando com os achados de OLIVEIRA (2008) e OLIVEIRA et al. (2010) após experimento na espécie canina.

Modelos animais experimentais, como os cães, estão sendo largamente utilizados para avaliar a eficácia das células-tronco em diversas áreas como na ortopedia, oftalmologia, odontologia, cardiologia e neurologia (OLIVEIRA, 2008), no intuito de servirem como futuras investigações em seres humanos, mas o assunto ainda gera polêmica em diversos países do mundo (AQUINO et al., 2002; NARAZAKI & CRISTANTE, 2011). Porém, apesar do otimismo científico, ainda são necessários alguns pontos a serem explorados sobre essas células, como os mecanismos envolvidos na diferenciação celular, regeneração e recuperação funcional em lesões diversas, almejando assim melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dos pacientes acometidos (SANTOS et al., 2004; CASTRO-SILVA et al., 2010).

CONCLUSÕES

Embora os resultados positivos obtidos na utilização de células-tronco como auxílio no tratamento de inúmeras enfermidades, muitos questionamentos ainda não foram solucionados. Os estudos e pesquisas tentam esclarecer que a grande preocupação de sucesso e insucesso dos procedimentos de cultura celular encontra-se na quantidade de obtenção de células, viabilidade e diferenciação nos meios utilizados.

Os modelos experimentais de células-tronco animais têm propiciado informações relevantes para transplantes em humanos e informações pré-clínicas importantes tanto para a terapêutica da medicina humana como da veterinária.

REFERÊNCIAS

AQUINO, L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; CASTRO, M. B.; MARQUES, L. C.; MALHEIROS, E. B. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p. 8-18, 2002.

ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; PINTO, W. V. M.; MEDEIROS, R. L. F.; SILVA, D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cadernos de Saúde Pública**, v.15, n. 3, p. 425-32, 2007.

BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, H. R.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A. P. E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 22-4, 2006.

BOYÜM, A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 97, n. 1, p. 9-29, 1968.

BRUNO, B.; GOERNER, M. A.; NASH, R. A.; STORB, R.; KIEM, H. P.; MCSSWEENEY, P. A. Purified canine CD34+Lin-marrow cells transduced with retroviral vectors give rise to long-term multi-lineage hematopoiesis. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 7, n. 10, p. 543-51, 2001.

CARLO, R. J. D.; KAWATA, D.; VILORIA, M. I. V.; OLIVEIRA, D. R.; SILVA, A. S.; MARCHESI, D. R.; GALVÃO, S. R.; AZEVEDO, P.; MONTEIRO, B. S. Polímero derivado de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciência Rural**, v.33, n. 6, p.1081-88, 2003.

CARVALHO, A. C. C. Células-tronco: medicina do futuro. **Revista Ciência Hoje**, v. 29, n. 172, p. 26-31, 2001.

CASTANIA, V. A. **Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena** [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo; 2007.

CASTRO-SILVA, I. I.; COUTINHO, L. A. C. R.; GRANJEIRO, J. M. Revisão sistemática sobre o uso de células-tronco mesenquimais em terapias de perdas ósseas. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 3, p.29-34, 2010.

COLOMÉ, L. M.; GOMES, C.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A. H.; LUGO, A. A.; GUIMARÃES, K. M.; FOERSTROW, L. P.; et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2529-34, 2008.

DEL CARLO, R. J. Células-tronco - Células da esperança. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 35, p.60-8, 2005.

HAMZÉ, A. L.; PACHECO, A. M.; BÉRGAMO, M.; JÚNIOR O. P. S.; DOTTA, S. C. N.; SACCO, S. R.; FILADELPHO, A. L. Células-tronco na Medicina Veterinária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, p.1-4, 2009.

HANS, F. R. D.; PERIN, E. C.; BOROJEVIC, R.; SILVA, A. S.; SOUZA, A. L. S.; SILVA, G. V.; ASSAD, J. A. R.; ROSSI, M. I. D.; MESQUITA, C. T.; DOHMANN, H. J. Melhora sintomática e da capacidade de exercício após o transplante autólogo, transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sustentada até o sexto mês de evolução. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.84, n. 5, p. 360-6, 2005.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, v.35, n. 3, p. 232-242, 2006.

LEITE, R. S.; DOHMANN, H. F. Uso de células-tronco aplicado à cardiologia. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3, n. 3, p. 1-5, 2004.

LIMA, S. A. F.; WODEWOTZKY, T. I.; LIMA-NETO, J. F.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; ALVARENGA, F. C. L. Diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 463-9, 2012.

MULLER, D. C. M.; PIPPI, N. L.; BASSO, P. C.; OLSSON, D. C.; SANTOS JUNIOR, E. B.; GUERRA, A. C. O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2243- 51, 2009.
NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-9, 2006.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; GODOY, A. V. Quantificação de células CD34+ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 434-41, 2009.

NARAZAKI, D. J.; CRISTANTE, A. F. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 4, p.359-67, 2011.

OLIVEIRA G. K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão** [Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2008.

OLIVEIRA, B. J. N. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado á inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos** [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2009.

OLIVEIRA, G. K.; RAISER, A. G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F. Z.; MARTINS, D. B.; DESENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E. B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L. B.; TOGNOLI, G. K.; PIPPI, N. L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 72-9, 2010.

PEREIRA, I. S. O.; PONTES, P.; EÇA, L. P.; FERREIRA, A. T.; MAZZETTI, P. M. V.; SILVA, L.; SOUZA, F. C. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta ORL**, v. 26, n. 3, p. 11-16, 2008.

SANTOS, R. R.; SOARES, M. P. B.; CARVALHO, A. C. C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 490-5, 2004.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-9, 2005.

SOARES, A. P.; KNOP, L. A. H.; JESUS, A. A.; ARAÚJO, T. M. Células-tronco em Odontologia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 1, p.33-40, 2007.

SOUZA, L. C. G.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J. R.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 20, n. 3, p. 270-8, 2005.

ZAMPROGNO H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 289-290, 2007.

