

COLETA E ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS.

Michelle Elisa Meletti Vieira, Ana Liz Garcia Alves, Ana Paula Balesdent Barreira. – Inter-áreas- Medicina Veterinária - Departamento de Cirurgia e Anestesiologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu.

A célula tronco é um tipo especial de célula que possui características únicas que as distinguem de outros tipos celulares. Essas características incluem: grande capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, garantindo um número considerável de células e a perpetuação destas por muitas gerações; diferenciação, processo pelo qual as células não especializadas, sob condições fisiológicas ou experimentais, podem ser induzidas a se transformarem em células com funções especiais; e plasticidade, ou seja, sua capacidade de se converter de um tipo a outro de célula podendo se diferenciar em células de tecidos completamente distintos.

Ao final do século passado e início deste, diversas pesquisas tem sido realizadas visando a utilização das células-tronco para substituir células e tecidos lesionados. Os avanços médicos têm sido representados em grande parte por um interesse crescente no uso das células tronco em terapia de doenças degenerativas e de doenças que apresentam respostas insatisfatórias aos tratamentos atuais, sendo denominada esta técnica de terapia celular. Nesse contexto se insere a medicina regenerativa, a qual visa regular o processo de regeneração dos tecidos por meio do implante de células tronco (Mota et al., 2005).

Recentemente a sociedade científica vem testando o implante de material obtido da medula óssea como tratamento de estruturas tendo-ligamentosas, o que tem se mostrado viável, tendo em vista que a medula óssea é abundante em componentes da reparação como células-tronco mesenquimais, fatores de crescimento e outros componentes da matriz colágena.

O potencial de replicação indiferenciada e maturação em diferentes tecidos mesenquimais incluindo ósseo, cartilaginoso, adiposo e tendíneo sugere o uso da célula tronco na bioengenharia, visando a regeneração de tecidos lesados por meio de seu implante (Smith et al., 2003).

De acordo com Schmitt & Ringe (2003), as células mesenquimais apresentam um maior potencial para produzir matriz tendínea do que tecido de cicatrização, diferindo assim dos tratamentos convencionais de tendinite, que constitui uma das principais lesões músculo-esqueléticas do cavalo atleta.

Nos indivíduos adultos as células precursoras podem ser obtidas por meio da punção da medula óssea. Em equinos o esterno é o sítio de escolha para a técnica, pois a atividade hematopoiética persiste na esternobra por toda a vida do animal, os ossos são cobertos por massa muscular delgada e a cavidade medular é revestida por uma fina camada de osso, facilitando o acesso a esta região. As desvantagens da punção neste local são a posição desconfortável e perigosa da pessoa que coleta a amostra e a relativa proximidade de órgãos vitais, como o coração. (Speirs, 1999; Thomas, 2003).

Contrariando as descrições da técnica de punção do esterno em equinos, onde o animal é submetido a anestesia geral e decúbito dorsal (Herthel, 2002; Thomas, 2003); neste estudo foi realizada a punção aspirativa do esterno com o animal em posição quadrupedal e sob sedação, conforme descrito por Speirs (1999) e Smith et al. (2003).

A contenção correta e a tranquilização do animal minimiza as possíveis complicações relacionadas ao procedimento. A preparação cirúrgica do local de punção e as técnicas de assepsia devem minimizar o risco de infecções iatrogênicas. Se o paciente apresenta anomalias de coagulação, como trombocitopenia ou coagulação intravascular disseminada pode ocorrer hemorragia. O controle da hemorragia pode ser realizado por pressão direta no local da punção por três a cinco minutos. Caso a condição do paciente seja severamente complicada, uma transfusão sanguínea pode ser realizada. O clínico deve ser cuidadoso ao introduzir a agulha diretamente na esternobra, para evitar a entrada na cavidade torácica. O risco de pneumotórax, hemorragia incontrolada ou laceração cardíaca pode ser reduzido pela monitoria da agulha durante o procedimento (Morris & Whitlock, 1983).

O preparo dos esfregaços de medula óssea merece cuidadosa atenção, uma vez que a coleta de medula óssea pode ser falsamente improdutiva, caso o esfregaço seja de má qualidade. Se o anticoagulante não for utilizado na coleta, as lâminas deverão ser preparadas imediatamente, e quando

há anticoagulante na amostra, o esfregaço poderá ser realizado até uma hora após a coleta (Katheleen, 2000).

Os esfregaços devem ser rapidamente secos ao ar, para uma melhor manutenção da morfologia celular. Diferentes pigmentos, como o de Romanowsky ou hematoxilina e eosina, podem ser utilizados na avaliação de rotina da medula óssea aspirada. A concentração dos corantes é maior quando comparada à concentração utilizada para corar esfregaços de sangue periférico.

Sendo assim, o objetivo deste projeto foi realizar a coleta e isolamento de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de eqüinos, avaliando a viabilidade da técnica descrita.

Foram utilizados 12 animais da espécie eqüina, clinicamente sadios, com idade de 4 a 7 anos, entre machos e fêmeas, sem raça definida e com peso entre 350 e 450kg.

Os animais foram mantidos no Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Campus de Botucatu. Foram pesados e vermifugados com ivermectin¹ na dose de 200 µg/kg via oral, 12 dias antes do início do experimento e mantidos confinados em baias individuais, recebendo água, alimentação concentrada e balanceada e feno “coast-cross”.

Os animais foram mantidos em estação, contidos em brete e sedados com romifidina² na dose de 0,4 mg/kg via endovenosa. Em seguida, foi realizada a tricotomia de uma área de 5 x 20 cm na região referente ao esterno de cada eqüino, permitindo a execução do exame ultra-sonográfico (Fig. 1). Após localizada a 5^a esternebra, o bloqueio anestésico local foi realizado com 10 ml de lidocaína³, seguido de anti-sepsia local. Foi introduzida a agulha de punção de medula óssea, modelo *Jamshidi*⁴, de calibre 8 gauge e 15 cm de comprimento. Uma vez bem fixa a agulha dentro do esterno, retirou-se o mandril e realizou-se a aspiração da amostra de medula óssea com auxílio de uma seringa de 20mL contendo 1mL de heparina a 1000 UI/mL (Fig. 2). A primeira alíquota foi expelida em placa de Petri para a verificação a olho nu da presença de espículas e glóbulos de gordura, sugerindo a origem medular da amostra. Após este procedimento, foram coletadas outras cinco alíquotas acondicionadas em seringas de cinco mililitros, contendo 1mL de heparina cada. As amostras foram identificadas, acondicionadas em gelo e encaminhadas ao Laboratório de Pesquisas do Departamento de Genética do Instituto de Biociências (UNESP, Botucatu) para a separação da fração mononuclear.

Para o isolamento da fração mononuclear foram realizadas algumas adaptações nas técnicas descritas nos trabalhos consultados.

Além da observação a olho nu de grânulos acinzentados (espículas) em placa de Petri, ao chegar ao laboratório uma pequena porção de cada amostra foi utilizada para realização de esfregaços, que sob a coloração Romanowsky, permitiram a confirmação da origem da amostra, se medula óssea ou sangue periférico (Fig. 3). Toda a manipulação da amostra em laboratório realizou-se em fluxo laminar, a fim de se evitar contaminação.

Uma vez confirmada a origem medular, a amostra foi diluída em PBS e filtrada em equipo de transfusão⁵ para remoção dos agregados celulares. Em seguida o filtrado foi delicadamente depositado em Ficoll Hypaque⁶ e centrifugado a 500 g por 30 minutos a temperatura ambiente, a fim de realizar a separação de seus constituintes por gradiente de concentração. Após centrifugação, foi formado um anel esbranquiçado, rico na fração mononuclear da medula óssea, entre o plasma e os resíduos eritrócitos. Esta camada foi retirada e lavada por duas vezes em PBS e novamente centrifugada 500 g por 10 minutos (Fig. 4). A fração mononuclear foi submetida ao teste de viabilidade celular por exclusão do azul tripan 0,2%⁷.

A contenção em brete, associada a tranquilização demonstrou-se adequada para a punção de medula óssea do esterno, apesar da posição desconfortável que a pessoa que realiza o procedimento precisa adotar.

¹ Equalan- Merck Sharp & Dohme

² Sedivet- Boehringer

³ Xilestesin 2%- Cristália

⁴ Technology, Sao Paulo

⁵ Embramed, Sao Paulo

⁶ Ficoll Hypaque Plus (d=1,077) Sigma Chemical Co.

⁷ Merck

Verificou-se a necessidade de treinamento do responsável pela coleta da amostra, uma vez que nas primeiras punções, algumas amostras foram provenientes de sangue periférico e não da medula óssea.

Inicialmente houve dificuldade na distinção macroscópica entre medula óssea e sangue periférico, porém após período de ajuste da técnica de punção, tornou-se possível identificação da amostra em placa de Petri. Características como consistência gelatinosa, presença de agregados celulares, grânulos (espículas) e glóbulos de gordura foram observados em medula óssea, características bem diferentes do sangue periférico. Apesar da possibilidade de definição macroscópica da origem da amostra, esta foi sistematicamente confirmada pela microscopia óptica em coloração Romanowsky, a qual revelou-se adequada para a análise da morfologia celular.

A classificação da amostra foi especialmente útil na fase de treinamento para a punção, no entanto após a definição da 5ª esternbra como sítio ideal de punção para a técnica descrita em animais em estação, todas as amostras continham células indiferenciadas em marcante proporção, caracterizando sua origem medular.

Em média, obteve-se 10-12 mL de medula óssea em cada animal, sendo este volume obtido em diversas alíquotas. Inicialmente foi utilizada seringa de 20 mL para promover intensa pressão negativa, sendo esta posteriormente substituída por cinco seringas de 5 mL heparinizadas.

Não houve perfuração pleural ou cardíaca, caracterizando a segurança da técnica.

Inicialmente, a separação da fração mononuclear foi dificultada pela presença de coágulo e fibrina (Fig. 5). Após o treinamento da punção e a filtragem de medula óssea através de filtro contido em equipes de transfusão de sangue, esta dificuldade foi superada, sendo possível a obtenção da fração mononuclear.

As amostras, após o isolamento da fração mononuclear, variaram de 0,5 a 0,7 mL em seu volume.

Foi realizado o teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul tripan 0,2% (figura 5), onde se observou uma média de 86,5% de células viáveis. Os resultados individuais estão representados na Tab. 1.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Média
% de células viáveis	76	82	74	95	90	92	89	92	86	80	90	92	86,5

Tabela 1. Representação dos valores individuais do teste de viabilidade celular.

Observou-se que a técnica da punção de medula óssea em esterno de eqüinos em estação, como descrito por Smith et al. (2003) é viável, apesar do desconforto causado à pessoa que coleta a amostra, devido à posição em relação ao animal e a força ventro-dorsal necessária para a penetração da agulha. A viabilidade da realização desta técnica deve ser ressaltada neste projeto, uma vez que os demais artigos publicados sobre a punção de medula óssea em eqüinos desenvolvidos por Herthel (2002) e Thomas (2003), a descrevem com animais mantidos em decúbito dorsal e sob anestesia geral.

A tranquilização adotada mostrou-se eficiente na contenção para este procedimento, quando o animal foi posicionado no brete, não sendo necessária a anestesia geral, como descrito por Herthel (2002) e Thomas (2003). Desta maneira, o custo e risco da técnica foram reduzidos.

Apesar do tamanho da agulha e da extensa penetração no tecido ósseo, não foi observada manifestação de dor, sugerindo a eficácia do bloqueio anestésico aliado à sedação. No entanto, para avaliação adequada na mensuração da dor, seria necessário monitorar-se outros parâmetros.

Foram coletados em média 10-12 mL de medula, sendo esta quantidade suficiente para a obtenção da amostra, com pequeno volume (0,5 a 0,7 mL), pois segundo Redding e colaboradores (1998), volumes superiores a 1 mL, quando injetados no tendão, promovem lesão de fibras por compressão. Todos os animais foram submetidos à punção de apenas um local e caso fosse necessária uma amostra de maior volume, demais sítios poderiam ser explorados, como sugerido por Katheleen (2000).

A aparência macroscópica das amostras mostrou-se semelhante às descrições de Car & Blue (2000), sendo caracterizadas por sangue com gotículas de gordura e presença de pequenos grânulos acinzentados (espículas). Entretanto, não encontramos descrição na literatura quanto à consistência

gelatinosa da amostra, especialmente da primeira alíquota e sua persistência em formar pequenos agregados celulares, apesar do anticoagulante.

O procedimento de separação mononuclear foi possível com a técnica descrita, o que vem ao encontro com os resultados obtidos por Perin et al. (2003), que descreveu procedimento similar em humanos. Smith et al. (2003) realizou técnica semelhante em equinos, porém com cultivo das células mesenquimais *in vitro*.

O teste de viabilidade celular antes do implante foi realizado por Perin et al. (2003), com resultado superior (96%) ao obtido nesta pesquisa (76%). Os demais trabalhos publicados na espécie equina não realizaram este procedimento (Herthel, 2002; Thomas, 2003; Smith et al., 2003). A discrepância de resultados entre a espécie humana e equina demonstra a necessidade de ajuste do procedimento à espécie, a ser realizado em futuras pesquisas. É possível que a utilização de centrifuga refrigerada diminua a morte celular, pois o procedimento requer até 30 minutos de centrifugação, o que resulta em aquecimento do equipamento, caso este não seja refrigerado. Acredita-se na importância do teste de viabilidade celular prévio ao implante, a fim de assegurar a confiabilidade do mesmo.

A técnica de punção aspirativa de medula óssea do esterno, realizada em equinos mantidos em posição quadrupedal, mostrou-se viável, ressaltando seu baixo custo e reduzido risco ao animal, tornando possível futuramente o acesso à terapia celular aos profissionais que atuam também a campo.

Além disso, esta técnica possibilita as pesquisas de terapia celulares na espécie equina, a partir de células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea.

Portanto, a técnica desenvolvida neste estudo torna possível implementar o uso de células-tronco obtidas de medula óssea tanto em experimentos, quanto nas aplicações clínico terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HERTHEL, D.J. Suspensory desmitis therapies equine. In: ACVS Veterinary Symposium, 2002. *Proceedings...* San Diego, 2002. p.165-167.
- KATHELEEN, P.F. Bone marrow evaluation. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. (ed.). *Shalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lippencott Williams and Wilkins, 2000. p.29-32.
- MORRIS, D.D.; WHITLOCK R.H. Relapsing idiopathic thrombocytopenia in a horse. *Equine Veterinary Journal*, v.15, p.73-75, 1983.
- PERIN, E.C.; DOHMAN, F.R.; BOROJEVIC, R. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, v.107, p.2294-2302, 2003.
- SCHMITT, B.; RINGE, J. Initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation*, v.71, n.9-10, p.567, dez. 2003.
- SMITH, R.K.W.; KORDA, M.; BLUNN, G.W et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, v.35, n.1, p.99-102, 2003.
- MOTA, A.C.A.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares- perspectiva do hematologista. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.27, n.2, p.126-132.
- THOMAS, H.S. Mending with marrow. *Sports Medicine*. p.53-56, 2003.