

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS

Ana Liz Garcia Alves^{1,2}
Michelle Elisa Meletti Vieira³
Anna Paula Balesdent Barreira⁴
Ligia Souza Lima Silveira da Mota⁵
Mere Erika Saito⁴
Aguemi Kohayagawa⁶
Carlos Alberto Hussni⁷
Marcos Jun Watanabe⁸
Patrícia Galvão Gomes de Oliveira⁴

RESUMO

A medula óssea é uma das fontes de células precursoras em indivíduos adultos e sua obtenção pode ser realizada por meio de punção aspirativa. O estudo teve por objetivo avaliar a técnica de punção de medula óssea e definir um protocolo para isolamento das células mononucleares de equinos. Doze equinos adultos foram submetidos à punção de medula óssea. Após separação da fração mononuclear por gradiente de densidade, foi realizado o teste de viabilidade celular, verificando-se uma média de 86,9% viabilidade. Com o domínio da técnica será possível implementar a terapia celular em equinos, tanto em experimentos, quanto nas aplicações clínico-terapêuticas.

Palavras-chave: fração mononuclear, célula tronco, punção aspirativa, medula óssea, equino.

PROTOCOL OF ISOLATION OF EQUINE MONONUCLEAR CELLS FROM BONE MARROW

ABSTRACT

In adults, the stem cells are found at the bone marrow and their isolation could be accessed by aspiration technique. This experiment aimed to evaluate the bone marrow aspiration technique and define a protocol for isolation of equine mononuclear cells. Twelve horses were submitted to bone marrow aspiration. After isolation of mononuclear cells by density gradient, the cell viability was determined obtaining a media of 86.9% of viable cells. According to the more knowledge obtained, the stem cell harvest experiment and clinical approach can be implemented in this specie.

Key words: mononuclear fraction, stem cell, aspiration, bone marrow, equine.

¹ Agradecimento: **FAPESP**

² Professora Adjunta - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP, anaalves@fmvz.unesp.br

³ Aluna de Iniciação Científica - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁴ Acadêmico Pós-Graduando - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁵ Professora Assistente Doutora - DG - IB - UNESP, Botucatu - SP.

⁶ Professora Titular - DCV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁷ Professor Adjunto - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP.

⁸ Aluno Pós-Doutorado - DCAV - FMVZ - UNESP, Botucatu - SP, watanabe@fmvz.unesp.br

Correspondência para: Profa. Dra Ana Liz Garcia Alves, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ - UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Caixa Postal 560, CEP: 18618-000, Botucatu - SP. Tel: (14) 3811 6252 Fax: (14) 3811 6072

PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE LA MÉDULA ÓSEA DE EQUINOS

RESUMEN

La médula ósea es una de las fuentes de estas células precursoras en individuos adultos y su aislamiento puede ser realizado en equinos mediante punción por aspiración. Este experimento tiene por objetivo estudiar la técnica de punción de medula ósea y definir un protocolo para la separación de las células mononucleares de equinos. Doce equinos fueron sometidos a la punción de la médula. Después de la separación de la fracción mononuclear mediante gradiente de densidad, fue realizada la prueba de viabilidad celular, donde se verificó un promedio de 86,9% de células viables. Con el dominio de la técnica será posible implementar la colecta y obtención de las células troncales para la terapia celular en equinos, tanto experimentalmente, como en las aplicaciones clínico-terapéuticas.

Palabras-clave: fracción mononuclear, célula tronco, punción por aspiración, médula ósea, equino.

INTRODUÇÃO

As células tronco são genericamente definidas como células indiferenciadas capazes de se auto-renovar e podem ainda se diferenciar em linhagens e tipos celulares específicos (1).

Atualmente, os avanços médicos demonstram um interesse crescente na utilização das células-tronco no tratamento de doenças degenerativas e naquelas que apresentam respostas lentas ou insatisfatórias aos tratamentos tradicionais, sendo esta área denominada de terapia celular. Assim, se busca regular o processo de regeneração de células e tecidos lesados por meio do implante de células tronco (2).

Das células tronco adultas já estudadas, as mesenquimais possuem ampla capacidade de diferenciação, sendo denominadas de pluri ou multipotentes, podendo se diferenciar em osso, cartilagem, tendão, ligamento, músculo e células gordurosas, e são obtidas de diversas fontes de tecido conjuntivo, como da medula ósea, gordura, músculo, cartilagem, osso trabecular e tendões (3).

Os tratamentos com células-tronco na medicina equina utilizam-se de implantes autólogos destas células, empregadas clínica ou experimentalmente, tendo como principal destaque a sua aplicação no tratamento de tendinites (4, 5), que constituem uma das principais lesões músculo-esqueléticas do cavalo atleta (6, 7).

Em equinos, diversas fontes celulares podem ser consideradas; porém o uso tem se limitado à obtenção das células de medula óssea e tecido adiposo, devido à facilidade de coleta, baixa incidência de lesão do local manipulado e possibilidade de coleta no indivíduo adulto (8). O esterno é o local de escolha para a aplicação da técnica, pois a atividade hematopoiética persiste por toda a vida do animal, e é recoberto por pouca massa muscular e de cortical delgada, facilitando o acesso à medula óssea.

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a punção do esterno para a obtenção de amostras de medula óssea, definir um protocolo de isolamento da fração mononuclear adequado à espécie e a avaliação da porcentagem de viabilidade das células em equinos adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Campus de Botucatu, durante o ano de 2007, sendo aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (parecer número 18/2006). Foram utilizados 12 equinos clinicamente sadios, com idade de 4 a 7 anos, machos e fêmeas, sem raça definida e com peso entre 350 a 450kg.

As punções de medula óssea foram realizadas com os animais mantidos em estação e contidos em tronco. Os animais foram sedados com xilazina 10% na dose de 0,5 mg/kg pela via intravenosa e tricotomia foi realizada na região do esterno. Após a identificação da 5ª esternebra por meio da ultra-sonografia, a anestesia local foi realizada com a aplicação de 15 mL de lidocaína sem vasoconstrictor no tecido subcutâneo e musculatura.

A punção de medula óssea foi realizada por meio da introdução de uma agulha modelo Komiyashiki, de calibre 8 gauge e 15 cm de comprimento, no sentido ventro-dorsal perpendicular à pele. Uma vez atingida a medula óssea, retirou-se o mandril e realizou-se a aspiração com seringa descartável de 20 mL, contendo 1 mL de heparina sódica (5000 UI/mL). Uma pequena alíquota dessa amostra foi colocada em uma placa de Petri para a avaliação macroscópica, sugerindo a origem medular da amostra. O procedimento de aspiração foi repetido com outra seringa de 20 mL, contendo também 1 mL de heparina.

A amostra foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (Dulbecco's Eagle's Modificado - DPBS) e filtrada em equipo de transfusão, para remoção dos agregados celulares. Em seguida, o filtrado foi delicadamente depositado em Ficoll e centrifugado a 500g por 30 minutos à temperatura ambiente, visando à separação dos constituintes por gradiente de densidade. Após a centrifugação, formou-se um halo esbranquiçado (Figura 1A) rico na fração mononuclear da medula óssea, entre o plasma e a porção contendo os eritrócitos com Ficoll. Este halo foi separado, diluído em DPBS e novamente centrifugado 300g por 10 minutos. Esta operação foi repetida por mais uma vez, a fim de se retirar totalmente o Ficoll.

A fração mononuclear foi submetida ao teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan (0,2%) (Figura 1B). O estudo de viabilidade foi realizado em microscópio óptico, fazendo-se a contagem de células mortas coradas e células íntegras não coradas.

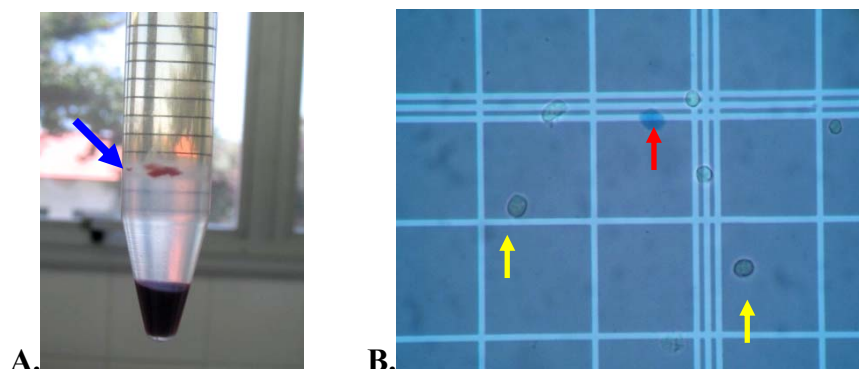


Figura 1. A: Formação do halo esbranquiçado (seta) contendo células mononucleares. B: Teste de viabilidade celular com azul de tripan. Seta vermelha indica célula não viável; setas amarelas mostram células viáveis. Botucatu – SP, 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume total das amostras da medula óssea obtidas com as duas seringas de cada animal foi de 10 a 12 mL, sendo que na análise macroscópica em placa de Petri foram observadas características como consistência gelatinosa, presença de agregados celulares, grânulos (espículas) e glóbulos de gordura.

O volume da fração mononuclear após o isolamento variou de 0,5 a 0,7 mL. Por meio do teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de tripan (0,2%), observou-se uma média de 86,9% de células viáveis (Tabela 1).

Tabela 1. Valores individuais e média das porcentagens da viabilidade celular de amostras obtidas por punção de medula óssea e submetidas ao teste por exclusão do corante azul de tripan 0,2% em 12 eqüinos. Botucatu – SP, 2007.

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	90	82	95	86,9

Foi observado que a realização da punção com contenção mecânica em tronco associada com a sedação e a anestesia local foi de baixo custo se considerados os materiais e fármacos utilizados. O procedimento com os eqüinos em apoio quadrupedal diminuiu possíveis riscos inerentes à anestesia geral.

A aparência macroscópica das amostras foi caracterizada por sangue com gotículas de gordura e presença de pequenos grânulos acinzentados (espículas). Entretanto, a consistência gelatinosa da amostra, especialmente da primeira alíquota, e sua tendência à formação de pequenos agregados celulares, mesmo na presença do anticoagulante, não havia sido relatada na literatura. Características essas relacionadas com a grande quantidade de substâncias tromboplásticas presentes na medula óssea.

Todos os animais foram submetidos à punção de apenas um local, e do volume total das amostras (10 a 12 mL) obtiveram-se, após o processamento, cerca de 0,5 mL de fração mononuclear, considerado suficiente para a aplicação, por exemplo, na maioria das lesões tendíneas de eqüinos. Não se observou vantagem ao se coletar grandes volumes, pois as células progenitoras concentraram-se nos primeiros mililitros de sangue medular (1).

A utilização da heparina sódica similarmente ao proposto por Smith e Webbon (9), proporcionou uma concentração final de aproximadamente 1.000 UI de heparina por mL de amostra de medula óssea e possibilitou uma adequada manipulação em laboratório.

Smith et al. (10) realizaram o isolamento da fração mononuclear em eqüinos, sem a completa descrição da técnica, seguido do cultivo das células mesenquimais *in vitro*. Os trabalhos publicados referentes às células tronco na espécie equina não apresentam a metodologia utilizada na separação da fração mononuclear após coleta de medula óssea. O protocolo de isolamento destas células nas técnicas já descritas para outras espécies necessita de adaptações, pois os cavalos apresentam rápida coagulação do sangue medular e formam agregados celulares mesmo na presença de anticoagulantes.

Apesar do uso constante em pesquisas de células cultivadas, alguns experimentos utilizam medula óssea total para o tratamento de tendinites (11, 12), ou ainda o implante da própria fração mononuclear (4). O uso desta fração em tratamentos de lesões ortopédicas tem a vantagem de poder ser realizada no momento do diagnóstico, com menor tempo de preparo e custos, e ainda aumenta a concentração de células tronco mesenquimais para o implante direto, sendo o número de CTM na fração mononuclear de 0,001% a 0,01% (3). No entanto, esta é uma mistura heterogênea de tipos celulares (8).

O teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul tripan (0,2%), cujo resultado alcançou 86,9% na presente pesquisa, foi inferior aos 96% obtido por Perin et al. (13) antes do implante em humanos. Contudo, como os demais trabalhos publicados para espécie eqüina (10, 11) não realizaram tal teste, a comparação das porcentagens foi comprometida, havendo, assim, necessidade da realização de futuras pesquisas com a avaliação da viabilidade da fração mononuclear obtidas da medula óssea de equinos.

CONCLUSÕES

1. O protocolo descrito mostrou-se eficaz para a obtenção e isolamento da fração mononuclear em equinos, utilizando-se heparina sódica como anticoagulante, seguido de filtragem e diluição do material proveniente da medula óssea.

2. As células isoladas mantiveram uma boa viabilidade celular, tornando este material adequado para a realização de implante intra-lesional, ou mesmo para cultivo de células mesenquimais.

REFERÊNCIAS

1. Sutter WW. Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. *Clin Tech Equine Pract.* 2007; 6: 198-208.
2. Mota ACA, Soares MBP, Santos RR. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares- perspectiva do hematologista. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005; 27: 126-32.
3. Fortier LA, Smith RKW. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2008; 24: 191-201.
4. Barreira APB, Alves ALG, Saito ME, Amorim RL, Kohaygawa A, Menarim BC, et al. Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *Int J Appl Res Vet Med.* 2008; 6: 46-54.
5. Alves ALG. Contribuições para o estudo da tendinite eqüina [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2008.
6. Alves ALG, Hussni CA, Nicoletti JLM, Thomassian A, Watanabe MJ. Efeitos do sulfato de condroitina intra-muscular e oral no tratamento de tendinite aguda experimental de equinos. *Rev Bras Ciênc Vet.* 2004; 11: 143-6.
7. Alves ALG, Fonseca BPA, Amorim RL, Thomassian A, Hussni CA, Nicoletti JLM. Effect of extracorporeal shock wave treatment on equine tendon healing. *International society for musculoskeletal shock wave therapy. Newsletter.* 2005; 1: 12-4.
8. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. Stem cell in veterinary medicina – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 2007; 25: 409-16.
9. Smith RKW, Webbon PM. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn?. *Br J Sport Med.* 2005; 39: 582-4.
10. Smith RKW, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potencial novel treatment. *Equine Vet J.* 2003; 35: 99-102.
11. Herthel DJ. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. In: *Proceedings American Association of Equine Practitioners - Annual Convention; 2001, San Diego. San Diego: AAEP; 2001. p.319-21.*
12. Rosenbrock A, Jacobi R, Jaugstetter H, Brehm W. Autologous bone marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses - a clinical case control study. In: *Proceedings in 12th Escot Congress; 2004, Monique. Monique, p.264-5.*

13. Perin EC, Dohman HFR, Borojevic R, Silva SA, Souza ALS, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003; 107: 2294-302.

Recebido em: 14/03/2008

Aceito em: 07/08/2009