

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DO ASPIRADO MEDULAR
DE FETOS CANINOS

LARA CAROLINA MÁRIO¹, JÉSSICA BORGHESI¹, ANA CAROLINA LANDENTIN MELLO²,
MARIA ANGÉLICA MIGLINO², CARLOS EDUARDO AMBRÓSIO³, DANIELE MARTINS³, ANA
FLÁVIA DE CARVALHO⁴, CRISTIANE VALVERDE WENCESLAU⁴

¹ Graduandas do 2º ano do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário da Fundação Octávio Bastos, Av. Doutor Octávio bastos s/n, 13874159, São João da Boa Vista/SP

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP

³ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP

⁴ Professoras doutoras do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação Octávio Bastos, Av. Doutor Octávio bastos s/n, 13874159, São João da Boa Vista/SP.

RESUMO: A medula óssea adulta é uma fonte de células-tronco (CT), que incluem as células-tronco hematopoéticas (CTH) que originam toda linhagem hematopoética definitiva; e as células-tronco mesenquimais (CTM), e ou estromais que são responsáveis por fornecer um ambiente propício para a hematopoese. Além destes principais tipos celulares a medula óssea é composta por diversos progenitores, células diferenciadas e matriz extracelular. Este ambiente onde são encontradas as CT recebe o nome de nicho, pois abriga uma grande quantidade de CT e progenitores celulares que são mantidos quiescentes, atuando normalmente e ou frente a injúrias. Porém pouco se sabe sobre o nicho da medula óssea fetal. Sabe-se que o nicho da medula óssea é derivado durante a ontogênese do saco vitelino, que posteriormente migram para diversos órgãos hematopoéticos como placenta e fígado se instalando por ultimo na medula óssea. Desta forma o presente trabalho visa descrever morfológicamente os tipos celulares da medula óssea fetal canina com 40 e 60 dias de gestação. Para isto foram utilizados 6 úteros de cadelas prenhes para a coleta do aspirado medular do osso fêmur e posterior análise morfológica estrutural e ultraestrutural. Os resultados demonstraram que a medula óssea fetal canina com 60 dias de gestação possui tipos celulares semelhantes ao da medula óssea adulta bem como CT, podendo assim ser utilizada como fonte de isolamento de CT.

PALAVRAS-CHAVE: cão, células-troco, medula-óssea, morfologia, nicho

INTRODUÇÃO

A medula óssea adulta é uma das principais fontes de CT, nela residem três principais sistemas celulares como: células hematopoéticas, endoteliais e estromais (células mesenquimais ou não-hematopoéticas) (DEANS e MOSELEY, 2000). Dentre os tipos de CT se destacam as células-tronco mesenquimais (CTM). Estas células são multipotentes, com capacidade de diferenciar em diferentes tipos celulares *in vitro* e *in vivo*, sendo amplamente utilizadas na terapia celular para as mais diversas patologias como, doenças autoimunes, osteoarticulares, infartos do miocárdio entre outras (ZAGO e COVAS, 2006).

Este ambiente no qual as CT se encontram é denominado de nicho. O nicho foi proposto em 1978, SCHOFIELD, o qual sugere a existência de compartimentos fixos em tecidos adultos por onde as mesmas residem. Este microambiente fisiológico, que consiste de células especializadas, secreta sinais e fornece moléculas da superfície celular para controlar a taxa de proliferação de CT, para determinar a diferenciação das células progenitoras e proteger CT contra a apoptose.

Porém pouco se sabe sobre o nicho de CT da medula óssea fetal. Sabe-se que os tecidos fetais (TF) são compostos por nichos transitórios, sendo uma fonte em potencial para a investigação de nichos de CT, pois apresentam propriedades primitivas e possuem um potencial intermediário entre as células-tronco embrionárias (células pluripotentes derivadas do embrião) e as células-tronco adultas (CTA) (THOMSON et al. 1998). CTM já foram isoladas a partir de medula óssea de fetos humanos, as quais demonstraram alto potencial de proliferação *in vitro* com capacidade de diferenciar em tecidos mesodermiais (CAMPAGNOLI et al., 2001).

Por este motivo, o presente estudo visa identificar morfologicamente as CT residentes na medula óssea de fetos de cães através da análise morfológica e ultraestrutural destas células. Desta forma iremos contribuir diretamente com as pesquisas de biologia do desenvolvimento e terapia celular, sendo que estes procedimentos são realizados com grande êxito em modelos animais.

O objetivo do presente trabalho foi identificar morfologicamente as *CT* e as *células residentes no nicho medular fetal canino*.

MATERIAS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados seis fetos que tinham idade gestacional entre 40 a 60 dias de gestação. As idades foram determinadas através da técnica de Crowrump (EVANS E SACK, 1963). Todos os animais utilizados na pesquisa eram oriundos de campanhas de castração realizadas na cidade de São Paulo. As células da medula óssea foram coletadas a partir do osso fêmur através da lavagem do canal medular, com auxílio de uma seringa de 3-ml e agulhas 25X7. A análise morfológica das células derivadas da medula óssea de fetos caninos deu-se por meio da técnica de esfregaço celular sendo fotografadas pelo microscópio invertido NIKON ECLIPSE TS100, enquanto que a análise morfológica foi promovida através da técnica rotineira de microscopia eletrônica de transmissão.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Em cães, há indícios que atividade hematopoiética pode ser detectada na terceira semana de vida pré-natal (JAIN, 1993) enquanto que em humanos a atividade hematopoiética pode ser observada com 11 a 12 meses de gestação (CHARBORED et al. 2002). Isto pode ser confirmado em nossos estudos em fetos de cães com aproximadamente 60 dias de gestação, nos quais identificamos células hematopoiéticas maduras no esfregaço medular. Fato evidenciado pela grande quantidade de hemácias presentes nos esfregaços sanguíneos, além de nítidas variedades morfológicas dos progenitores e precursores hematopoiéticos em diferentes graus de maturação celular.

Dentre a linhagem hematopoiética destacam-se: rubriblastos, rubríctos policromáticos, metarrubríctos, reticulócitos e eritrócitos. Em cães adultos a série de maturação eritrocítica possuía coloração azulada intensa, tanto o citoplasma quanto o núcleo (JAIN, 1993). Dentre a linhagem granulocítica identificou-se, mieloblastos, promielócitos, mielócito neutrófilo e ao comparar com a medula óssea adulta de cães não foram identificados somente os mielócitos (JAIN, 1993). Foi constatada a pequena presença de precursores plaquetários quando comparado com os demais tipos celulares. Estes dados são compatíveis com os resultados encontrados para cães adultos e humanos em outros trabalhos (JAIN, 1993).

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível identificar células com características similares à CT, que incluem núcleo celular grande e escasso citoplasma. Apresentam cromatina eletrodensa disposta de forma homogênea no núcleo, enquanto que outras células eram caracterizadas por apresentar o núcleo com variações de eletrodensidade, sendo dividido em regiões eletrodensas (heterocromatina), localizada na periferia nuclear e áreas menos eletrodensas (disposta na região central do núcleo (eucromatina). Quando comparamos a morfologia de células indiferenciadas com células em estágios mais avançados de diferenciação, observamos sinais de condensação da cromatina. Células com características similares foram identificadas na medula óssea de fetos de camundongos sendo denominada pelos autores como "very small embryonic like cell" (KUCIA et al. 2006). Estas células expressavam marcadores de CT embrionárias; demonstrado na medula.

CONCLUSÃO

Ao realizar-se a pesquisa podemos dizer que a medula óssea de fetos caninos com 60 dias de gestação apresenta morfologicamente similar aos tipos celulares encontrados na medula óssea adulta com grande número de CT, e células diferenciadas, o que indica a sua plena atividade.

Desta forma a medula óssea fetal canina pode ser considerada uma fonte de isolamento e expansão de CT e progenitores, podendo ser considerada uma nova fonte para a obtenção de CT.

REFERENCIAS

- CHARBORD, P; OOSTENDORP, R; PANG, W; HÉRAULT, O; NOEL, F; TSUJI, T; DZIERZAK, E; PÉAULT, B. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues. **Experimental Hematology**, Oct. V.30, n.10, p.1202-10, 2002.
- CAMPAGNOLI C; ROBERTS, I.A; KUMAR, S; BENNETT,P.R; BELLANTUONO, I; FISK, N.M. (2001). **Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow**. *Blood* 98: 2396-2402
- DEANS, ROBERT J; MOSELEY, ANNEMARIE B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p.875-884, 2000.
- EVANS, H.E; SACK W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat.*, **Histology and Embryology**, v.2, p.11-45,1973.
- KUCIA, M; RECA, R.; CAMPBELL, FR. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(p)SSEA-1(p)Oct-4p stem cells identified in adult bone marrow. **Leukemia**, v.20, p. 857–869, 2006.
- JAIN, NEMI CHAND. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993. p. 417
- SCHOFIELD R. The **relationship between the spleen colony-forming cell and haemopoietic stem cell**. **Blood Cell**. 1978; 4:7-25
- THOMSON J.A; ITSKOVITZ-ELDOR J; SHAPIRO S.S; WAKINITZ M.A; SWIERGIEL J.J; MARSHALL V.S; JONES J.M. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts**. **Science** (1998) 282: 1145-1147.
- ZAGO, MARCO A; COVAS, DIMAS, T. Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso: São Paulo, 2004; **Células-tronco, a nova fronteira da medicina** - São Paulo: Editora Atheneu, 2006.