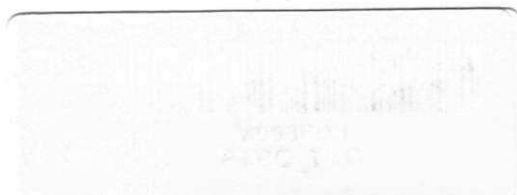


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Considerações sobre o uso de células-tronco no processo de
cicatrização óssea**

Paulo Sóstenes de Oliveira Carvalho



2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Considerações sobre o uso de células-tronco no processo de
cicatrização óssea**

Paulo Sóstenes de Oliveira Carvalho
Graduando

Prof. Dr. Pedro Isidro de Nóbrega Neto
Orientador

Patos
Outubro de 2011

11 51 43
288 11
Docentes



Biblioteca Setorial do CDSA. Maio de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /UFCG
CAMPUS DE PATOS -PB

C376c

2011

Carvalho, Paulo Sóstenes de Oliveira

Consideracoes sobre o uso de células-tronco no processo de cicatrização óssea / Paulo Sóstenes de Oliveira Carvalho. - Patos - PB: UFCG/UAMV, 2011.

31fl.: il.

Inclui Bibliografia.

Orientador: Pedro Isídoro da Nóbrega Neto
(Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1- Ortopedia – Veterinária. 2 – Regeneração óssea 3- Célula-tonco.

CDU: 615.8:636.8

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

PAULO SÓSTENES DE OLIVEIRA CARVALHO
Graduando


Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM: 28./10./11...

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto


Prof. Dr. Eldiné Gomes de Miranda Neto


Prof. Dr. Sergio Ricardo Araújo de Melo e Silva

Dedico este trabalho à minha
família, em especial à minha mãe,
Tarcila Pereira de Oliveira,
e à **Thayse Camboim,** por estarem
sempre presente ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **DEUS** por ter me dado o dom da vida e por ter sempre mantido suas mãos sobre mim, me protegendo e abençoando.

Em especial, à minha Mãe, **Tarcila Pereira**, por ter sido o grande exemplo da minha vida, tanto na vida profissional como também na vida pessoal, por ter me apoiado em todas as minhas decisões e principalmente por ter sido uma excelente mãe e amiga.

Agradeço também ao meu pai **Paulo Hélio** (in memorian), pois na maior parte das minhas lembranças estava sempre sorrindo e me mostrando o lado bom de tudo.

Em especial à, **Thayse Camboim** pelo seu carinho, amor e companheirismo nesses últimos anos de faculdade. Um grande estímulo pra todas as dificuldades e uma alegria na minha vida. Só tenho a te agradecer por tudo. Te amo muito.

Ao meu **Tio Antônio**, que foi o meu segundo pai. Sempre me ajudou nos momentos difíceis e sempre foi muito presente na minha vida.

Ao meu amigo **Danilo** (Torú) que sempre me incentivou a estudar mais e que foi parceiro de diversas cachaças e farras sem tamanho tanto aqui em Patos quanto no Juazeiro.

A todos os amigos que fiz em Patos, em especial para **Acácio, Edgar, Diogo** (.com), **Dannylo** (Martin), **Nilton, Matheus** (Java), **Daniel** (Boneco), **Davi, Vinicius, Rodrigo** (Nego), **Daniel** (Vareta).

Ao meu orientador, professor **Pedro Isidro**, que teve muita consideração e paciência para me ajudar na elaboração desse trabalho.

Aos professores dessa universidade, **Sérgio Melo, Carlos Peña, Almir, Norma, Gil, Graça** (Leite), **Nara, Edmilson Lúcio, Sara, Eldinê, Flávio, Verônica, Patrícia, Marcilio, Ana Lucélia, Moraes, Melânia, Sônia Lima**, que sempre tornaram essa universidade um canto acolhedor, tanto para o aprendizado como para passar se divertindo no que gostamos de fazer.

A todos os funcionários que direta e indiretamente foram fundamentais nesta etapa da minha vida. Em especial a **Damião** (Night).

E a todos que sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade.
Meu Muito Obrigado.

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE FIGURAS.....	07
RESUMO	08
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Osso.....	11
2.2 Componentes ósseos.....	11
2.3 Fraturas.....	12
2.3.1 Classificação das fraturas.....	12
2.3.1.1 Presença de ferida externa comunicante.....	12
2.3.1.2 Morfologia da fratura.....	13
2.3.1.3 Estabilidade após a recolocação na posição anatômica normal.....	15
2.4 Vascularização óssea.....	15
2.5 Cicatrização óssea.....	17
2.6 Enxertos ósseos obtidos de medula óssea.....	18
2.7 Células tronco.....	18
2.7.1 Origem das células tronco.....	19
2.7.2 Tipos de células tronco.....	19
2.8 Coleta de células-tronco da medula óssea.....	21
2.9 Células tronco em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.....	24
2.10 Implantação da célula tronco no local da fratura.....	25
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Classificação das fraturas. (A) Fraturas fechadas. (B) Fraturas abertas.....	13
Figura 2	Classificação das fraturas conforme a direção da linha de fratura. (A) Transversa. (B) Oblíqua. (C) Espiral. (D) Cominutiva. (E) Segmentária. (F) Impactada.....	13
Figura 3	Classificação das fraturas de acordo com a extensão do trauma ósseo. (A) Fratura completa. (B) Fratura incompleta (fratura em galho verde). (C) Fratura incompleta (fissura).....	14
Figura 4	Suprimento sanguíneo de um osso imaturo.....	16
Figura 5	Suprimento sanguíneo de um osso adulto.....	16
Figura 6	Célula pluripotente derivada do blastocisto e os tecidos que podem originar	20
Figura 7	Colheita de medula óssea de um cão, com acesso pela fossa trocantérica (A) e pela asa do íleo (B) através de pressão negativa em seringa previamente heparinizada.....	22
Figura 8	Apresentação da medula óssea sendo colhida para a bolsa coletora (A) e filtragem da mesma através de filtros de 200 μ contidos no <i>kit bonemarrow</i> (B).....	23
Figura 9	(A) Nuvem de células mononucleares (seta), isolada em gradiente de densidade, após centrifugação do sangue de medula óssea. (B) Botão celular, contendo células mononucleares, obtido após centrifugação.....	23
Figura 10	Colheita de uma alíquota de 3ml de medula óssea da bolsa de infusão, usada para contagem da porcentagem de células nucleadas e teste de viabilidade celular.....	24
Figura 11	Esponja de colágeno sendo embebida com o botão celular de células-tronco mononucleares.....	25
Figura 12	Relação entre a medula óssea autógena, enxertos ósseos e a reparação óssea.....	26

RESUMO

CARVALHO, PAULO S. O. Considerações sobre o uso das células-tronco no processo da cicatrização óssea. 31p. Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, 2011.

O osso proporciona a sustentação necessária para que a musculatura possa funcionar e também serve de proteção para órgãos vitais. Quando ocorre algum trauma nesse tipo de tecido a sua recuperação demora um longo período, além de gerar grandes custos e fazer com que o animal passe um tempo prolongado sem exercer suas atividades. Por possuírem um potencial ilimitado de proliferação e auto renovação as células-tronco auxiliam na redução desse espaço de tempo. Essas células possuem as propriedades necessárias para favorecer o processo cicatricial como osteoindução, osteocondução e osteogênese. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o processo de cicatrização óssea com a utilização das células tronco, uma vez que este tema é de grande relevância na atualidade.

Palavras Chaves: Osso, trauma, regeneração.

ABSTRACT

CARVALHO, PAULO S. O. Considerations on the use of stem cells in the bone healing process. 31p. Completion of Course Work - Monograph (Course of Veterinary Medicine) - Federal University of Campina Grande (UFCG), Patos, 2011.

Bone provides the necessary support for the muscles to function and also serves as protection for vital organs. When a trauma occurs in this type of tissue recovery takes a long time, with major costs and make the animal go a long time without exercising their activities. Because they have an unlimited potential for proliferation and self-renewing stem cells help reduce this time. These cells have the properties required to promote the healing process as osteoinduction, osteoconduction and osteogenesis. The objective of this study was to evaluate the bone healing process with the use of stem cells, since this topic is of great relevance today.

Keywords: Bone, trauma, regeneration.

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) caracterizam-se pelo potencial ilimitado de proliferação e auto-renovação e pela capacidade de originar linhagens celulares com diferentes funções, possibilitando até regenerar tecidos. Estas células possuem a melhor capacidade de se dividir dando origem a células semelhantes às progenitoras. Elas têm a capacidade de diferenciarem-se em diferentes tecidos (MIR, 2006).

O osso é um sistema vivo com inúmeras funções, além de propiciar uma estrutura sobre a qual a musculatura pode funcionar, também protege órgãos vitais e abriga a medula óssea (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Sabe-se que vários tipos celulares estão em investigação em experimentos com animais, porém o maior potencial terapêutico está nas células-tronco. Tem se realizado estudos envolvendo o tratamento de grandes lesões ósseas, as quais não têm possibilidade de regeneração espontânea. Nesses casos, são utilizadas células-tronco medulares injetadas em matrizes ósseas, que permitem que as células-tronco se diferenciem em células ósseas, promovendo a regeneração do tecido lesado (CORRÊA, 2009).

Terapias alternativas, que auxiliem na recuperação de fraturas, são muito importantes, pois podem minimizar o tempo de tratamento e os custos, e garantir o retorno mais rápido às atividades normais (DOUAT, 2004). Atualmente, a possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade devido ao seu inigualável potencial terapêutico e tornou-se a principal alternativa da terapia celular (LAI *et al.*, 2008).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o processo de cicatrização óssea com a utilização das células tronco, uma vez que este tema é de grande relevância na atualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Osso

O osso pode ser considerado tecido ou órgão. Como tecido, caracteriza-se por um tipo especializado de conjuntivo, cuja principal característica é a rigidez, devido ao elevado conteúdo de minerais. Como órgão é uma estrutura composta por vasos, cartilagem, tecido conjuntivo fibroso, tecido adiposo e tecido hematopoiético (WASSERMAN et al., 1993).

O osso exerce duas funções primárias: suporte estrutural e metabolismo do cálcio. Tem uma matriz protéica de colágeno que está impregnado de sais minerais, incluindo fosfato de cálcio (85%), carbonato de cálcio (10%) e pequenas quantidades de fluoreto de cálcio e fluoreto de magnésio. As fibras do colágeno que formam a matriz óssea são extremamente complexas. Para manter a estrutura normal do osso deve haver quantidade suficiente tanto de proteínas quanto de minerais (MARX; GARG, 1998).

O mineral encontrado no osso é um análogo do mineral hidroxiapatita de ocorrência natural. Esse mineral, assim como a matriz óssea inteira, está sendo constantemente removido (pelos osteoclastos) e reformado (pelos osteoblastos) em resposta a estresses normais mecânicos, bioquímicos e fisiológicos. O mineral ósseo está em equilíbrio com os líquidos corporais, ocorrendo desmineralização do osso quando a ingestão dos íons minerais (Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{-3}) necessários para a formação óssea é inadequada, como no raquitismo por deficiência de vitamina D ou quando a perda de cálcio é excessiva, como no hiperparatireoidismo (SLATTER, 2007).

2.2 Componentes ósseos

Há três tipos principais de células em todos os ossos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos, geralmente células redondas um tanto volumosas, com retículo citoplasmático abundante, são as células ósseas responsáveis pela síntese da matriz óssea (osteóide), e são encontrados na superfície de regiões formadoras de osso conhecidas como sistemas de Havers, que circundam vasos sanguíneos dentro da matriz da trama óssea. Uma vez cercados por mineral, os osteoblastos tornam-se osteócitos e não morrem. Em vez disso comunicam-se por meio de longos processos com outras células cercadas por mineral e células não cercadas. Os osteoclastos são grandes células

multinucleadas com bordas enrugadas que ficam na superfície da matriz mineralizadora, são os sensores mecânicos na matriz óssea. Essas células gigantes (com 20 a 100µm de diâmetro) são responsáveis pela remoção de minerais e da matriz (reabsorção óssea). Os osteoclastos dissolvem o mineral mediante a secreção de ácidos e em seguida de enzimas (fosfatase ácida, colagenase, catepsinas, proteases neutras), que digerem a matriz. No osso sadio, as atividades dos osteoclastos e dos osteoblastos são acopladas (por fatores protéicos liberados pelo osso); sendo assim, a reabsorção estimula a neoformação óssea (SLATTER, 2007).

2.3 Fraturas

O osso é um dos tecidos mais rígidos e resistentes do corpo, contudo, é frequentemente lesionado (DOUAT, 2004). A fratura é o rompimento completo ou incompleto da continuidade de um osso ou cartilagem. Uma fratura é acompanhada por vários graus de lesões junto aos tecidos moles circunjacentes, incluindo o aporte sanguíneo, e pelo comprometimento da função do sistema locomotor (PIERMATTEI et al., 2009).

2.3.1 Classificação das fraturas

As fraturas podem ser classificadas em várias bases, e todas são úteis em sua descrição. Essas bases incluem presença de ferida externa comunicante, morfologia e estabilidade da fratura após a redução axial dos fragmentos (PIERMATTEI et al., 2009).

2.3.1.1 Presença de Ferida Externa Comunicante

A fratura fechada não se comunica com o meio externo. Já na fratura aberta o local da fratura comunica-se com o meio externo, tornando essas fraturas contaminadas ou infectadas, e a consolidação pode ser complicada e retardada (PIERMATTEI et al., 2009) (Figura 1).

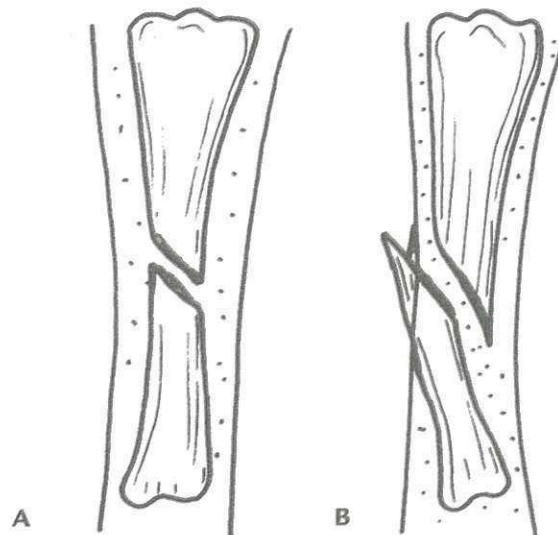


Figura 1 - Classificação das fraturas. (A) Fratura fechada. (B) Fratura aberta. FONTE: Denny; Butterworth (2006)

2.3.1.2 Morfologia da Fratura

Quanto à morfologia as fraturas podem ser classificadas como (Figuras 2 e 3):

- Fratura Transversa
- Fratura Oblíqua
- Fratura em Espiral
- Fratura Incompleta
- Fratura Completa
- Fratura Multifragmentar
- Fratura por Impactação

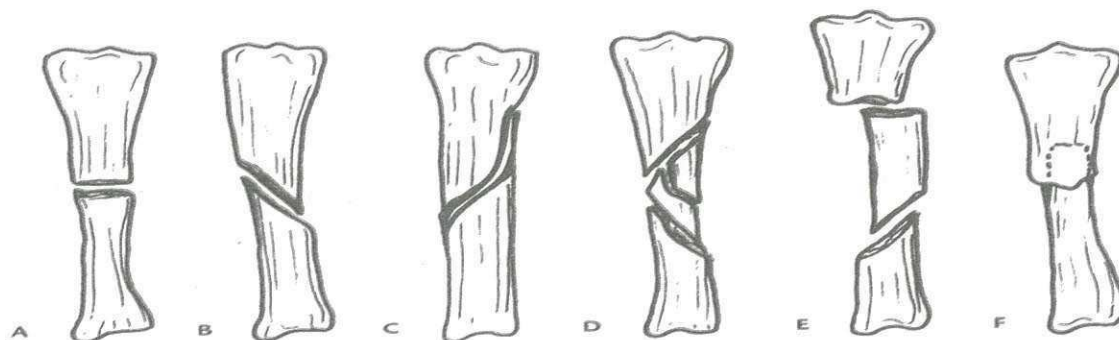


Figura 2 - Classificação das fraturas conforme a direção da linha de fratura. (A) Transversa. (B) Oblíqua. (C) Espiral. (D) Cominutiva. (E) Segmentária. (F) Impactada. FONTE: Denny; Butterworth (2006).

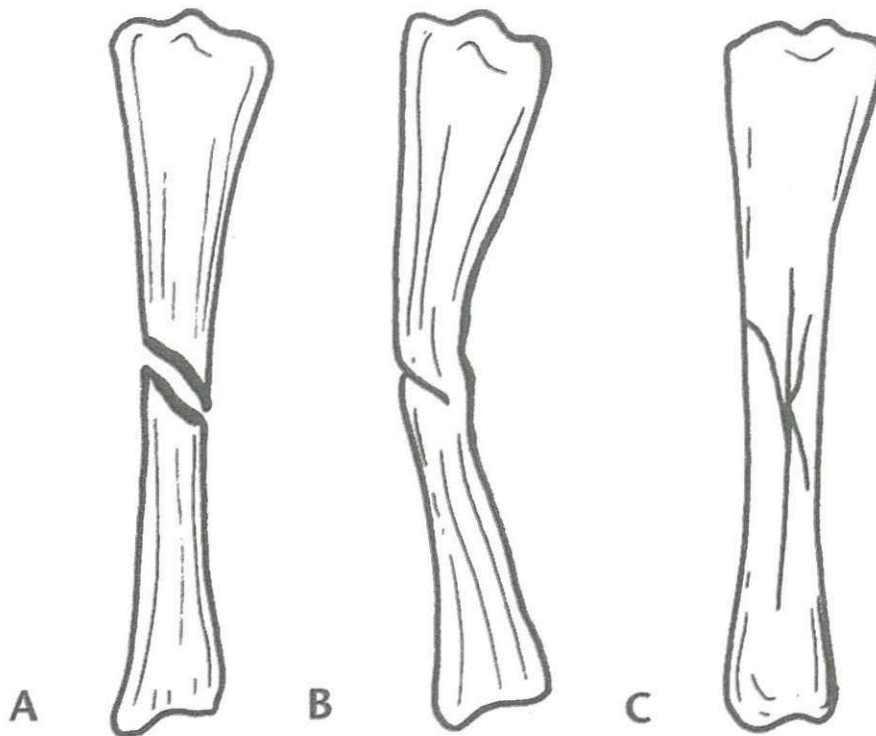


Figura 3 - Classificação das fraturas de acordo com a extensão do trauma ósseo. (A) Fratura completa. (B) Fratura incompleta (fratura em galho verde). (C) Fratura incompleta (fissura). FONTE: Denny; Butterworth (2006)

A fratura completa é aquela em que há total interrupção da continuidade do osso e é, normalmente, caracterizada por fragmentos deslocados. Fratura incompleta é aquela em que se mantém parcialmente a continuidade do osso, como nas fraturas em galho verde de animais jovens ou fissuras em animais adultos. A fratura transversa é aquela em que a linha da fratura forma um ângulo reto com o eixo longo do osso, enquanto a oblíqua é a que forma um ângulo ao longo do eixo do osso. Na fratura oblíqua curta a linha de fratura tem comprimento menor que o dobro do diâmetro do osso. A fratura espiral forma uma curva ao redor do osso. Na fratura cominutiva há vários fragmentos e as linhas de fraturas se comunicam. Já na fratura segmentária ou múltipla, o osso é fraturado em três ou mais segmentos e as linhas de fraturas não se comunicam e a fratura por impactação ocorre quando um fragmento ósseo penetra em outro (DENNY; BUTTERWHORT, 2006).

2.3.1.3 Estabilidade após a recolocação na posição Anatômica Normal

Fraturas Estáveis são as transversas, oblíquas curtas não pontiagudas ou em galho verde, nas quais os fragmentos ao serem reduzidos resistem às forças de encurtamento. A fixação se faz necessária para evitar a deformidade angular e, algumas vezes, a rotação. Dependendo do local, isso pode ser obtido por coaptação externa ou aplicação de um pino intramedular, fixador externo ou placa. Fraturas instáveis são oblíquas, espirais ou cominutivas. Os fragmentos ao serem reduzidos deslizam entre si, de forma que há necessidade de fixação para se manter o comprimento do osso, prevenir deformidade angular e rotação. Isso usualmente envolve aplicação de placa e parafuso ou fixador externo (DENNY; BUTTERWHORT, 2006).

2.4 Vascularização óssea

O suprimento sanguíneo apropriado é necessário para que o osso realize sua função fisiológica normal (Figura 4). Clinicamente, os maiores problemas vasculares surgem nos ossos longos. O suprimento sanguíneo desses ossos é derivado de três fontes básicas: o sistema vascular aferente, o sistema vascular intermediário do osso compacto e o sistema vascular eferente. O sistema aferente conduz sangue arterial e consiste na artéria nutrizante principal, nas artérias metafisárias e nas arteríolas periosteais nas junções musculares. As arteríolas são os componentes secundários do sistema aferente e suprem as camadas mais externas do córtex nas proximidades das firmes junções faciais ou musculares. Os vasos nos ossos compactos são intermediários entre os sistemas aferente e eferente e funcionam como treliça vascular onde ocorre a troca crítica entre o sangue e o tecido vivo ao redor. Esse sistema consiste nos canais corticais e nos canalículos minúsculos que transportam nutrientes aos osteócitos. O sistema eferente do osso cortical ocorre na superfície periosteal. O fluxo sanguíneo pelo córtex é essencialmente centrífugo, da medula para o periósteo (Figura 5). Embora outras drenagens venosas da cavidade medular estejam presentes, isso está ligado à atividade hematopoiética da cavidade medular (PIERMATTEI et al., 2009).

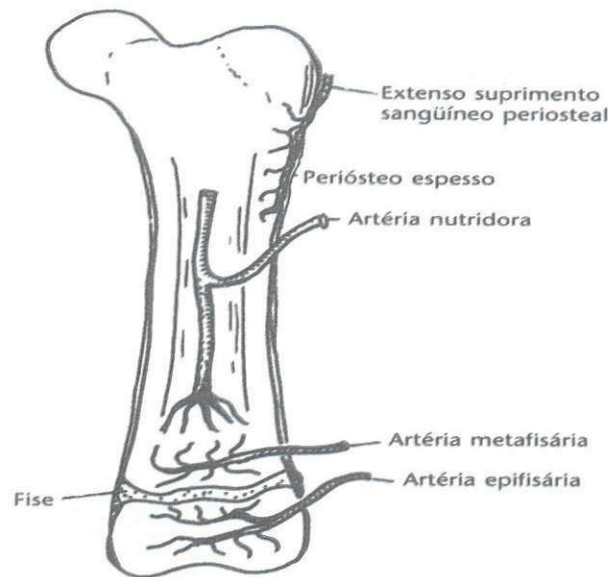


Figura 4 - Suprimento sanguíneo de um osso imaturo. Fonte: Denny; Butterwhort (2006)

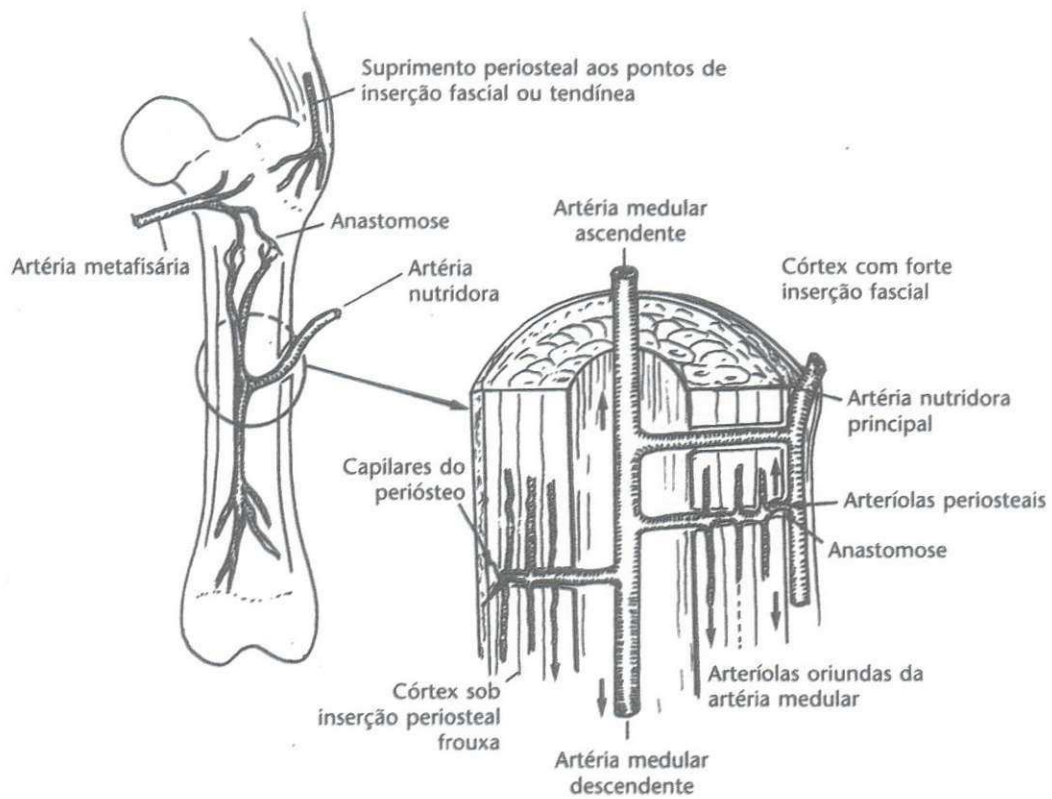


Figura 5 - Suprimento sanguíneo de um osso adulto. Fonte: Denny; Butterwhort (2006)

2.5 Cicatrização óssea

A cicatrização óssea corresponde ao processo biológico que ocorre após uma destruição cartilaginosa e óssea, que restaura a continuidade tecidual necessária para a função (FOSSUM, 2005).

A consolidação óssea é um processo complexo que envolve múltiplas fases que se superpõem. As respostas celulares próximas ao local da fratura levam primeiramente à produção de um tecido cartilaginoso, que posteriormente se calcifica. Esse molde cartilaginoso inicial é fundamental no reparo osso da maioria das fraturas e depende da proliferação e produção de matriz cartilaginosa não mineralizada pelos condrócitos (GUARNIERO et al., 2007).

A sequência dos eventos da consolidação óssea pode ser colocada como: hemorragia da área, formação de coágulo e inflamação e edema seguido por proliferação de células mesenquiais pluripotenciais, formação óssea e cartilaginosa e remodelamento do calo ósseo normal (PIERMATTEI et al., 2009).

Durante a fase inflamatória, o coágulo no foco de fratura contém plaquetas, fibrina, cininas e prostaglandinas. As plaquetas liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que é quimiotático para macrófagos e fibroblastos que, ao chegarem ao foco da lesão, liberam mais PDGF, além de fator de crescimento transformador beta ($TGF\beta$) e fator do crescimento fibroblástico. Adicionalmente, os macrófagos fagocitam fragmentos celulares e os osteoclastos reabsorvem células necrosadas e matriz óssea calcificada. Os fatores de crescimento estocados na matriz óssea – IGF-II, BMPs $TGF\beta$ – são liberados, iniciando-se a fase de reparo ósseo (REMEDIOS, 1999).

Slater, (2007), descreve a importância do suprimento sanguíneo extra-ósseo nos estágios iniciais da consolidação. Este suprimento é proveniente dos tecidos moles e é vital para a preservação do tecido de granulação. As células pluripotenciais presentes neste tecido respondem pela reabsorção osteoclástica das extremidades dos fragmentos da fratura. O tecido de granulação se torna gradualmente mais fibroso, melhorando a estabilidade e reduzindo o movimento dos fragmentos ósseos. A estabilidade reduz o grau de deformação interfragmentar permitindo que os tecidos com mais baixa tolerância à deformação e maior rigidez intrínseca sobrevivam no interior da lacuna. A deformação eventualmente é reduzida ao ponto que o osso sobrevive e une as extremidades do fragmento.

2.6 Enxerto ósseo obtido da medula óssea

Um enxerto ósseo ideal deve propiciar células osteogênicas que produzam osso novo, fatores osteoindutores que induzam a diferenciação de células ósseas a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e uma matriz osteocondutora, que atue como estrutura para o crescimento interno de osso novo (SLATER, 2007).

A medula óssea contém células-tronco osteoprogenitoras (pluripotentes) que são capazes de formar osso quando combinadas com vários elementos de uma matriz óssea. Grandes defeitos ósseos segmentares podem consolidar de forma bem sucedida após a adição de medula óssea cultivada ou fresca diretamente ou em combinação com esponjas de gelatina, matriz óssea desmineralizada, proteína morfogenética óssea ou implantes cerâmicos (SLATER, 2007).

O transplante de células-tronco dependendo do doador das células progenitoras pode ser classificado em:

- Alogênico: quando as células progenitoras são provenientes de um doador geneticamente distinto, mas da mesma espécie do receptor. Este tipo de transplante apresenta complicações relacionadas às reações imunológicas entre receptor e doador, desde a rejeição até a doença do enxerto-contra-hospedeiro.
- Autólogo: quando as células progenitoras utilizadas são do próprio paciente. Este tipo de transplante tem menos risco que o alogênico, por não existir nenhum tipo de reação imunológica entre receptor e doador (AZEVEDO; RIBEIRO, 2000).

2.7 Células tronco

As células-tronco (CT) são indiferenciadas, não-especializadas, podem gerar diferentes tipos de tecido no organismo e são capazes de auto-replicação, permitindo gerar cópias idênticas de si mesmas (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

Em 1999, um grupo de cientistas suecos demonstrou que células-tronco neurais de camundongos adultos têm um potencial generalizado de diferenciação, podendo formar qualquer tipo celular, de músculo cardíaco a estômago, intestino, fígado e rim, quando injetadas em embriões de galinha e de camundongos. A partir destes experimentos, consolidou-se a ideia de que células-tronco de organismos adultos retêm a capacidade proliferativa e de diferenciação em qualquer tipo celular do organismo,

independente de seu tecido de origem, desde que cultivadas sob condições adequadas (SANTOS et al., 2004).

2.7.1 Origem das células-tronco

Durante a formação do animal, logo na formação embrionária, a célula passa por uma evolução para que sejam então formados os órgãos e tecidos. O primeiro estágio de desenvolvimento é conhecido como mórula, que logo após se transforma em blástula e em seguida em gástrula. Nesse processo, as células passam por grandes rearranjos em que se define o plano corporal futuro. As células que darão origem aos músculos e órgãos internos migram para o interior do embrião, enquanto que as que originarão pele e sistema nervoso ficam na superfície (AMABIS; MARTHO, 2008).

O embrião, até a fase de mórula, é composto de células totipotentes, isto é, cada uma pode gerar um novo embrião. A partir de blastocistos, as células-tronco embrionárias não geram novo embrião, mas formam qualquer tipo de tecido, isto é, são pluripotentes. Considerando essa fase de desenvolvimento embrionário e a fase do indivíduo já formado, podemos classificar as CT em: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas (LUNA, 2007).

As CT possuem morfologia fibroblastóide, com alta capacidade para replicação e, após estímulo apropriado, podem diferenciar-se em vários tipos de células (CARDOSO et al., 2003).

2.7.2 Tipos de células tronco

São três as categorias de células-tronco. São consideradas células totipotentes ou embrionárias aquelas com potencial de completa diferenciação, enquanto que as pluripotentes ou multipotentes possuem capacidade de diferenciação parcial. As células que não se diferenciam exceto no tecido de origem, são denominadas unipotentes. Além de apresentar a multi-funcionalidade de se transformar em diversos tipos celulares, as células-tronco podem ser obtidas de vários locais como: embriões, sangue de cordão umbilical, medula óssea, células mesenquimais, células de tecidos e órgãos, células do sangue periférico e células hematopoiéticas (OLIVEIRA et al., 2006).

As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central

e periférico (GAGE, 2000). Correspondem às células do embrião recém-formado e têm potencial para originar até mesmo as células do folheto extraembrionário que formarão a placenta. Entretanto, estas células são efêmeras e desaparecem poucos dias após a fertilização (ROBEY, 2000). As pluripotentes (Figura 6) são células capazes de originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar a placenta e outros tecidos de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto depois dos quatro dias de vida e participam da formação de todos os tecidos do organismo (ROBEY, 2000). Estas células têm sido utilizadas na criação de animais transgênicos e possuem uma grande variedade de aplicações clínicas e comerciais. Apesar de existirem em menor número, as células-tronco pluripotentes estão presentes também em indivíduos adultos. Se oriundas da medula óssea, por exemplo, podem originar células de sangue, ossos, cartilagem, músculos, pele e tecido conjuntivo (GAGE, 2000).

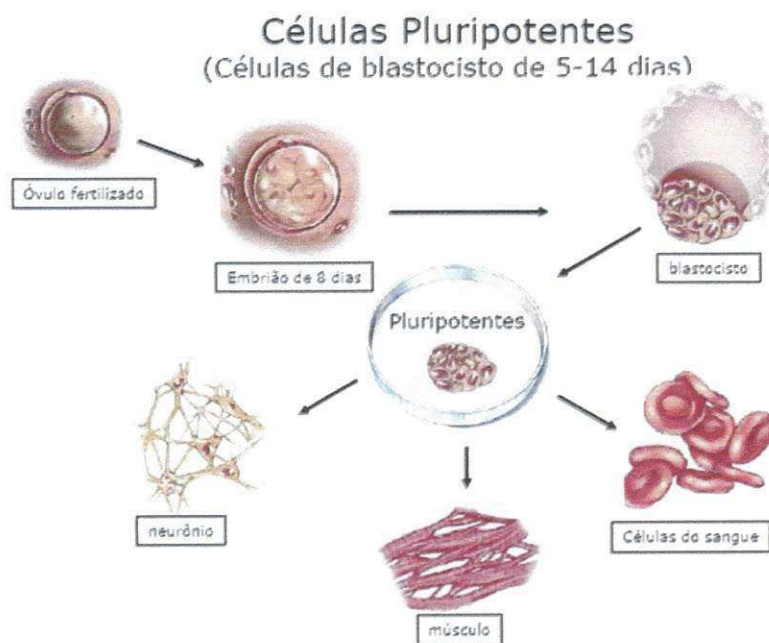


Figura 6 – Células pluripotentes derivada do blastocisto e alguns dos tecidos que podem ser originados. Fonte: Ferreira (2008)

As células onipotentes são denominadas células-tronco adultas, e residem em tecidos já diferenciados. O organismo possui uma pequena quantidade de células-tronco em vários tecidos e órgãos, onde ficam latentes até serem ativadas por uma enfermidade ou um ferimento. Ao contrário das embrionárias elas não se revelaram aptas a se transformar em todos os tipos de células e talvez se tornem apenas nos mesmos tipos de células dos tecidos de onde se originaram. Entretanto, com o avanço das pesquisas, a

existência desta categoria de células-tronco tem sido cada vez mais questionada, visto que células antes consideradas multipotentes, a exemplo das células-tronco neurais, têm se revelado pluripotentes (CLARKE et al., 2000).

As células-tronco adultas foram encontradas no cérebro, córnea, retina, coração, gordura, pele, polpa dentária, medula óssea, músculos esqueléticos, intestinos, vasos sanguíneos e no sangue. Podem então ser: CT hematopoiéticas, que são células presentes na circulação periférica, indiferenciadas com caráter pluripotente e grande capacidade de auto-renovação; CT neurais, onde cientistas comprovaram a capacidade de neurogênese em diferentes regiões cerebrais, mesmo o indivíduo adulto, e nessas regiões encontram-se CT multipotentes; CT do tecido muscular, que apresentam características de multipotencialidade e auto-renovação, exercendo também importante função no desenvolvimento muscular pós-natal, essas células são capazes de diferenciar-se em osteoblastos *in-vitro*; e por fim, as CT epiteliais, onde na epiderme, existe uma subpopulação de células basais que apresentam propriedades de célula-tronco somática, estas células estariam localizadas em estruturas chamadas “unidades proliferativas”, compostas por algumas células-tronco encarregadas de suprir o compartimento de células diferenciadas (SOUZA et al., 2003).

As células-tronco epidérmicas apresentam um alto nível de plasticidade tecidual e, quando transplantadas para um ambiente embrionário, podem ser reprogramadas e originar todos os estratos germinativos, o que torna o tecido da pele uma fonte de fácil obtenção de células-tronco (LIANG; BICKENBACH, 2002).

As células-tronco mesenquimais são células estromais não hematopoiéticas, que possuem capacidade de diferenciação, sendo capazes de diferenciarem-se em diversos tecidos, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo (POUNTOS; GIANNOUDIS, 2005), são pluripotentes, pois podem se proliferar indefinidamente *in vitro* sem se diferenciar (SANTOS et al., 2004).

2.8 Coleta de células-tronco da medula óssea

Segundo OLSSON et al. (2009), o processo de coleta das células mononucleares (CM) segue com o pré-operatório que consiste em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de seis horas. Em seguida, efetua-se a medicação pré-anestésica para a sedação do animal. Após todos os procedimentos para manipulação asséptica, os animais anestesiados e previamente tricotomizados são colocados em decúbito e submetidos à

colheita de sangue da medula óssea (MO). As amostras são obtidas por punção rotacional e aspiração com o auxílio de agulha anatômica do tipo Steis (15G X 3") e podem ser retiradas do tubérculo lateral do úmero, da região subtrocanterica ou côndilo medial de fêmur, da porção proximomedial da tíbia e da porção craniodorsal da espinha ilíaca (Figura 7). A quantidade média de medula a ser coletada é de 10ml/kg. As amostras são colhidas com auxílio de seringas de 10ml previamente heparinizadas com liquemine (heparina 10.000UI). Para penetrar no espaço medular dos ossos, deve ser aplicada uma pressão manual moderada à agulha, girado-a e alternando os movimentos para direita e esquerda. A MO colhida é transferida para uma bolsa de colheita de MO (*Bone Marrow Collection Kit*), contendo 0,1ml de liquemine (heparina 10.000UI) e 10ml solução salina a 0,9% para cada 100ml de MO (Figura 8). Após o término da colheita, o total de sangue intramedular passa por um pré-filtro de 850 micron, seguido de dois filtros, um de 500 micra e o segundo de 200 micra, acoplados em linha, para filtragem das espículas ósseas. O total de amostra sanguínea retirada é automaticamente transferido para uma bolsa de infusão própria de MO, também acoplada no mesmo *kit*.

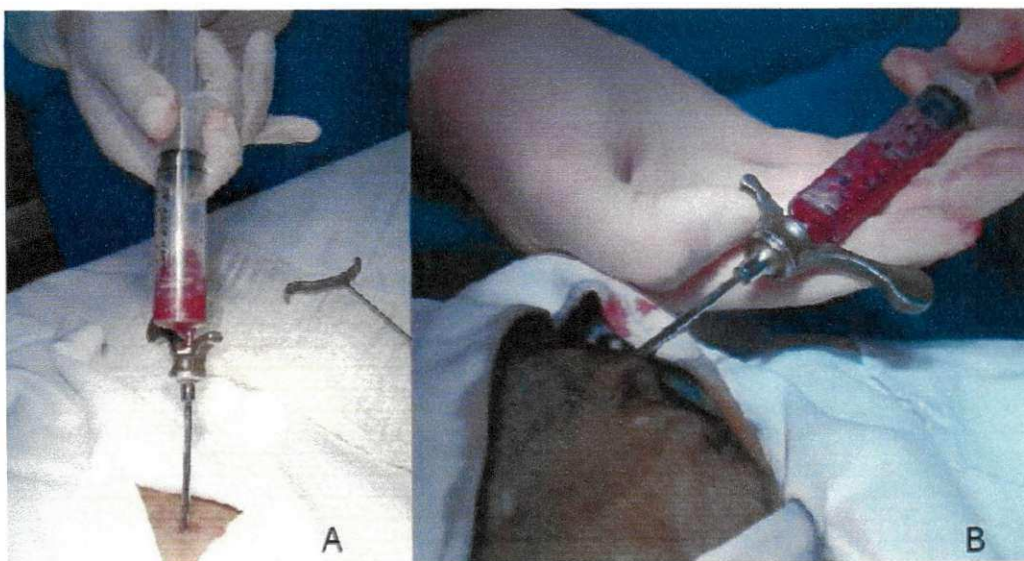


Figura 7 - Colheita de medula óssea de um cão, com acesso pela fossa trocanterica (A) e pela asa do íleo (B) através de pressão negativa em seringa previamente heparinizada. Fonte: Oliveira (2008)



Figura 8 - Apresentação da medula óssea sendo colhida para a bolsa coletora (A) e filtragem da mesma através de filtros de 200 μ (B) contidos no *kit bone marrow*. Fonte: Oliveira (2008)

A MO colhida é centrifugada a 1600 rotações por minuto (rpm) (força centrípeta de 440g) em tubos Falcon de 50ml e isolada em gradiente de densidade Histopaque 1.077g/ml (1:1), de acordo com a técnica de Boyum, mantendo-a a uma temperatura entre 18-26°C. O halo contendo as CM, formado depois da centrifugação, é colhido entre as interfaces lavadas e centrifugadas (5 minutos/440g) três vezes em meio contendo solução salina a 0,9%, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e soro sanguíneo autólogo estéril, com intuito de remover os agregados celulares, obtendo como produto final o botão celular padronizado em 1000 μ l (Figura 9) (OLSSON et al., 2008).

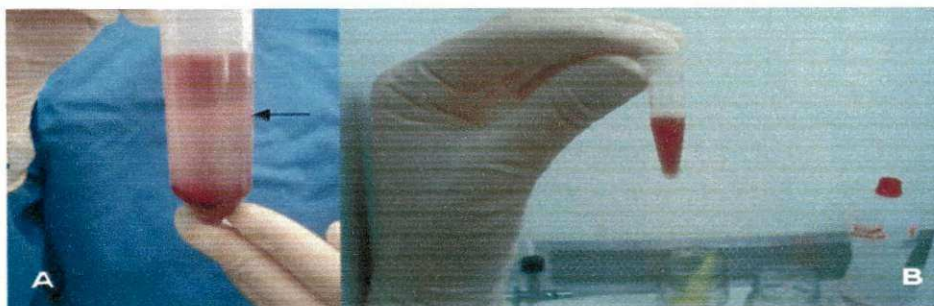


Figura 9 – (A) Nuvem de células mononucleares (seta), isolada em gradiente de densidade, após centrifugação do sangue de medula óssea. (B) Botão celular, contendo células mononucleares, obtido após centrifugação. Fonte: Oliveira (2008)

Uma pequena fração de CM é colhida (Figura 10) para contagem manual da porcentagem e quantificação de CM e teste de viabilidade celular por método de exclusão com corante azul de Tripanem lâmina de Neubauer, sendo considerada aceitável uma viabilidade acima de 90% (OLSSON et al., 2008).



Figura 10 - Colheita de uma alíquota de 3ml de medula óssea da bolsa de infusão, usada para contagem da porcentagem de células nucleadas e teste de viabilidade celular. Fonte: Oliveira (2008)

2.9 Células tronco em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos

A osteoindução é a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, também chamadas de células-tronco, em células osteogênicas, após contato com a matriz óssea (MARTINEZ; WALKER, 1999).

Para que haja a transformação da CT em outra célula, a mesma necessita receber um comando de uma célula vizinha. Quando os mecanismos de vigilância detectam uma sub-representação de um tipo celular específico, as células-tronco próximas são induzidas a sofrerem mitose. As mitoses de células-tronco são assimétricas, dando origem a duas células filhas de tamanhos diferentes. A maior será similar à sua parental, uma célula-tronco, e a menor irá se diferenciar em um tipo especializado de célula que ficou subpopulada no tecido. Como a divisão de uma CT sempre produz outra CT,

existe essencialmente um suprimento ilimitado de células de reposição para o reparo tissular (GRIFFITHS et al., 2006).

2.10 Implantação da célula tronco no local da fratura

As células indiferenciadas caracterizam-se por baixa taxa de crescimento, capacidade de auto-renovação e potencial para diferenciarem-se em várias linhagens celulares. Na reparação óssea, elas desempenham papel importante na osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio (BURWELL, 1985).

Para a implantação das células tronco, devemos levar em consideração o tipo de transplante que será feito. Segundo Oliveira (2008), o defeito ósseo pode ser preenchido com esponjas de colágeno (Figura 11) embebidas com o botão celular de células-tronco mononucleares.



Figura 11 - Esponja de colágeno sendo embebida com o botão celular de células-tronco mononucleares. Fonte: Oliveira (2008)

A medula óssea não é capaz de preencher grandes defeitos, devendo, nessas situações, estar associada a enxertos ou substitutos ósseos (CONNOLLY et al., 1989). Os enxertos auxiliam na incorporação de tecido ósseo em uma região fraturada por meio de quatro mecanismos: suporte mecânico, osteocondução, osteogênese e osteoindução, dependendo do tipo de enxerto utilizado (MARTINEZ; WALKER, 1999).

Segundo Marzarola e Pastori (2006), esses mecanismos são definidos como:

Osteogênese: formação e o desenvolvimento de tecido ósseo. Um enxerto osteogênico é derivado de uma parte de tecido envolvido no crescimento e reparo ósseo.

Osteoindução: ato ou processo de estimular a osteogênese. A osteoindução é ativa e representa a habilidade do enxerto em estimular a produção óssea pelo tecido receptor.

Osteocondução: ocorre quando uma matriz física serve de arcabouço para formação de um novo osso. A osteocondução é passiva, sendo representada pela habilidade do enxerto em permitir a invasão vascular e celular proveniente da área receptora.

A medula óssea pode ser usada como efetivo enxerto ósseo por si só e em combinação com outros materiais, sendo capaz de conferir/ampliar a propriedade osteogênica aos enxertos. No processo de reparação óssea, a medula pode desempenhar o papel de osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio. A osteogenicidade da medula óssea deve-se as células osteoprogenitoras do estroma, que contêm dois tipos celulares: as células precursoras ósseas determinadas e as células precursoras ósseas indutíveis, que na presença de fator indutível local expressam atividade osteogênica, por exemplo em fraturas e enxertos ósseos (DEL CARLO et al., 2004) (Figura 12).

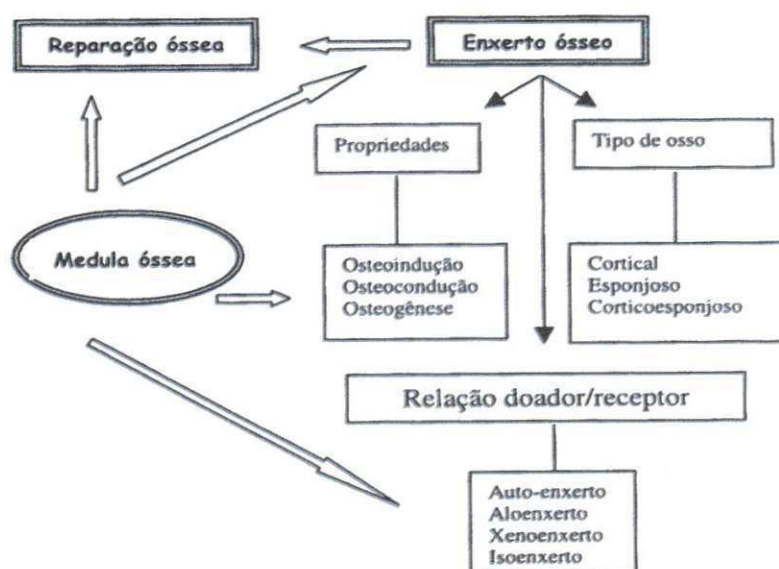


Figura 12 – Relação entre a medula óssea autógena, enxertos ósseos e a reparação óssea. Fonte: Del Carlo et al. (2004)

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células-tronco vêm sendo alvo de muito estudo dentro da medicina. Suas múltiplas formas de uso na terapêutica, seus diferentes locais de extração e suas várias formas de transformação as tornam algo promissor e com grande potencial dentro dos diversos tipos de tratamento.

Tendo em vista o seu desempenho na atuação do processo cicatricial, reduzindo consideravelmente o tempo que este processo dura e levando em conta que se trata de um enxerto autólogo, que não provocará risco de rejeição, o uso das células-tronco nesses procedimentos traz benefícios ao animal, uma vez que o mesmo tem sua recuperação mais rápida, evitando possíveis complicações devido ao longo tempo de imobilização, o custo é reduzido e os efeitos adversos são mínimos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da Biologia Moderna**. 4º ed, São Paulo: Moderna, 2008. cap. 9, p. 204-224.

AZEVEDO, W.; RIBEIRO, M.C.C. Fontes de células-tronco hematopoéticas para transplantes. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 381-389, out./dez. 2000

BURWELL, R.G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin. Orthop.**, n. 200, p.125-141, 1985.

CARDOSO, F. P.; GONZÁLES, J. H.; EZQUERRAS, E. A. Utilización de células madre para la regeneración miocárdica de la insuficiencia cardíaca. **Revista Española de Cardiología**, v. 56, n.10, p. 935-938, 2003.

CLARKE, D. L.; JOHANSSON, C. B.; WILBERTZ, J.; VERESS, B.; NILSSON, E.; KARLSTRÖM, H.; LENDAHL, U.; FRISE, J. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, Washington, DC, v.288, p.1660-1663, June 2000.

CONNOLLY, J.F.; GUSE, R.; LIPPIELLO, L.; DEHNE, R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **J. Bone Joint Surg.**, v.71A, p.684-691, 1989.

CORRÊA, R. **Células Tronco**. In: ABC da Saúde. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?602> células tronco >. Acesso em 11 de setembro de 2009.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. F.; PINHEIRO, L. C. P. Medula óssea autógena uma alternativa de enxerto em ortopedia veterinária. **Revista Ceres**, v. 51, n. 295, p. 300, 2004.

DENNY, H. R.; BUTTEWORTH, S. J. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4º ed., São Paulo: Roca, 2006. 496p.

DOUAT, E.S.V. **Estudo comparativo do efeito do ultrassom terapêutico de 1MHz com frequência de repetição de pulso de 100MHz e 16 Hz no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato**. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

- FERREIRA, J. **Célula tronco**. In: *Biologia*. Disponível em: <<http://www.mundovestibular.com.br/articles/5239/1/Celulas-Tronco/Paacutegina1.html>>. Acesso em 11 de agosto de 2011.
- FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2.ed., São Paulo: Roca, 2005. 1390p.
- GAGE, F. H. Mammalian neural stemcells. **Science**, Washington, DC, v.287, p.1433-1438, Feb. 2000.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. **Introdução à Genética**. 8º ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. cap. 17, p. 526-530.
- GUARNIERO, R.; MOLIN, É. D.; VAZ, C. E. S.; SANTANA, P. J.; CINAGAWA, F. T.; TATIBANA, W. S.. Avaliação do efeito da glicosamina e condroitina na consolidação de fratura: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 7, p. 201-205, jul. 2007.
- LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n.2, p.146 -159, 2008.
- LIANG, L.; BICKENBACH, J. R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. **Stem Cells**, Dayton, v.20, p.21-31, 2002.
- LUNA, N. Stem cells: basic research on health, from ethics to panacea. **Interface - Comunic.,Saúde, Educ.**, v.11, n.23, p.587-604, set/dez 2007
- MARTINEZ, S.A.; WALKER, T. Bone grafts. **Vet. Clin. North Am. Small Animal Practice**, v.29, p.1207-1220, 1999.
- MARX, Robert E; GARG ,Arun K. Estrutura óssea, metabolismo e fisiologia: seu impacto na implantodontia. **Revista Brasileira de Implantodontia**, v.7, n.4, p. 267-276, 1998.
- MARZOLA, C.; PASTORI, C.M. Enxertos em reconstruções de maxilas atroficas. **Revista Ato**, n. 4, p. 298-309, 2006.
- MIR, L. **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2006. cap. 16, p. 311-324.

- OLIVEIRA, G. K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tíbiais agudos experimentais de cão**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, RS.
- OLIVEIRA, L. A. C.; SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L. Conceitos e Aplicações de Células Tronco em Medicina Regenerativa: Uma Revisão. **RUBS**, Curitiba, v.2, n.2, p.32-42, abr./jun. 2006.
- OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; MARTINS, D. B.; TOGNOLI, G. K.; JÚNIOR, E. B. S.; MULLER, D. C.; LOPES, S. T. A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P. D.; TEIXEIRA, L. V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, v.39, n.1, Santa Maria, 2009.
- PIERMATEI, D. L.; FLO, G. L.; DECAMP, C. E. **Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais**. 4º ed., São Paulo: Manole, 2009. 934p.
- POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cell. **International Journal of the care of the injured**, v.365, p. S8-S12, 2005.
- REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **Vet. Clin. North Am. Small Animal Practice**, v.29, p.1029-1044, 1999.
- ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **J. Clin. Invest.**, Thorofare, v.105, n.11, p.1489-1491, June 2000.
- SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.6, Uberaba, Nov./Dez. 2004.
- SLATER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3º Ed., vol. II, São Paulo: Manole, 2007. seção 15, p. 1774 – 2306.
- SOUZA, V. F. LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A.; RAMALHO L. M. P.; SANTOS, J. N. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol.**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 251-256, jul./dez. 2003
- WAGNER, A.J.; WEISSMAN I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v.116, p.639–648, 2004.

WASSERMAN, R. H.; KALLFELZ, F. A.; LUST, G. Ossos, articulações e líquido sinovial. In: SWENSON, M. J. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1993. cap. 30, p. 488-520.