

ANDRESSA REGO DA ROCHA

MORFOLOGIA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CUTIA (*Dasyprocta prymnolopha*), ISOLAMENTO, EXPANSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROGENITORES ADERENTES POR MEIO DE CULTIVO CELULAR.

TERESINA
2011

ANDRESSA REGO DA ROCHA

MORFOLOGIA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CUTIA (*Dasyprocta prymnolopha*), ISOLAMENTO, EXPANSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROGENITORES ADERENTES POR MEIO DE CULTIVO CELULAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

TERESINA
2011

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

R672m Rocha, Andressa Rego da
Morfologia de células da medula óssea de cutia (*dasyprocta primnolopha*), isolamento, expansão e quantificação de progenitores aderentes por meio de cultivo celular / Andressa Rego da Rocha. – 2011.
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, 2011.

Orientação: Prof^a Dr.^a Maria Acelina Martins de Carvalho

Co-orientação: Prof^o Dr. Flávio Ribeiro Alves

1. Cutia - Morfologia. 2. Medula óssea. 3. *Dasyprocta* – Células-tronco. I. Título.

CDD: 636.089 1018

ANDRESSA REGO DA ROCHA

MORFOLOGIA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CUTIA (*Dasyprocta prymnolopha*), ISOLAMENTO, EXPANSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROGENITORES ADERENTES POR MEIO DE CULTIVO CELULAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho**

Co-orientador: **Prof. Dr. Flávio Ribeiro Alves**

TERESINA
2011

MORFOLOGIA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CUTIA (*Dasyprocta prymnolopha*), ISOLAMENTO, EXPANSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROGENITORES ADERENTES POR MEIO DE CULTIVO CELULAR.

ANDRESSA REGO DA ROCHA

Data da aprovação: 18/02/2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Piauí
(Presidente)

Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga
Escola de Artes, Ciências e Humanidades
Universidade de São Paulo
(Membro Titular)

Prof. Dr. Napoleão Argolo Martins Neto
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal
Universidade Federal do Piauí
(Membro Titular)

Prof. Dr. Flavio Ribeiro Alves
Curso de Medicina Veterinária/CPCE
Universidade Federal do Piauí
(Membro – Co-orientador)

À Deus, meu Pai, Mestre dos mestres, Amigo, Conselheiro, Ajudador e Consolador até aqui e para sempre.

Ao meu pai que sonhou com um nível superior para mim e à minha mãe que me acolheu em toda formação.

Aos meus irmãos, Atslands e Ajalmar Neto, pelo seu exemplo e conselhos desde a minha infância.

Aos meus amigos, que me deram as mãos nos momentos de dificuldade e foram como irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação e propiciar o ambiente para o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES pelo auxílio referente à concessão de bolsa durante todo período do mestrado.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro para aquisição dos materiais para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho por conceder orientação referente à pesquisa, pela oportunidade de realizar uma experiência científica inovadora no estado do Piauí, e por auxiliar no meu desenvolvimento como pesquisadora e contribuir para meu crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Flávio Ribeiro Alves pela co-orientação e participação na pesquisa, pela paciência e também pelo incentivo em momentos difíceis.

Ao pós-doutorando Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto pelo auxílio diário nas práticas em laboratório e disposição em contribuir sempre que necessário.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por compartilharem os seus conhecimentos e pelo estímulo a continuar me aperfeiçoando.

Aos companheiros do grupo de pesquisa Morfologia de Animais de Produção, apelidado como “Tropa de Elite”: Aírton Conde, Anaemília Diniz, Antônio Augusto, Danilo Menezes, Eunice Anita, Francisco Araújo, Hatawa Almeida, Maíra Ferraz, Márcia Rizzo, Sâmia Clara, Rosa Cabral, pela amizade e colaboração no dia-a-dia, e força nas horas de desânimo.

Ao aluno de graduação Gerson Tavares e a amiga pós-graduanda Yulla Klinger pela ajuda na coleta de dados deste trabalho.

Às bolsistas de trabalho, Gardênia e Janete, pela prontidão no apoio em atividades de laboratório.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela convivência e apoio ao longo desta jornada, em especial aos colegas: Juliana, Maurício, Georggia, Ricardo, Marcelo, Francisco Leite, Waleska, Maísa e Prianti.

Ao funcionário do Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Luís, pela paciência e ajuda sempre que necessário.

Aos servidores da UFPI: Arinaldo, Sérgio Guerra, Dirceu, Antônio Francisco, Celso e Fernando pela ajuda sempre que possível.

Aos amigos, Cristiana Kelly, Danielle Zacarias, Jocélia Pereira, Joyce Defensor, Rosemeire Moreira, Pr. Marcos Sérgio, pelos conselhos, apoio durante este percurso e estímulos a superar os desafios do mestrado.

Muito obrigada!

“Isto disse o que é Santo (...): Eu sou o que abre, e ninguém fecha, e fecha, e ninguém abre. Eu sei as tuas obras, eis que diante de ti pus uma porta aberta, e ninguém a pode fechar, tendo pouca força, guardaste a minha palavra e não negaste o meu nome”

(Apocalipse 3:7,8 – B. Sagrada)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CAPÍTULO I.....	18
Abstract.....	19
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e métodos.....	22
Resultados.....	25
Discussão.....	31
Conclusões.....	34
Agradecimentos.....	35
Referências.....	35
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Página

<p>Figura 1 – Fotomicrografias de extensão da medula da cutia. A: Precursor de linhagem mielóide ou linfóide (seta). B: Prolinfócitos (setas). C: Neutrófilo segmentado (seta) e eosinófilo (cabeça de seta). D: Rubrícito (seta) e promonócito (cabeça de seta). E: Promielócito (seta) e metarrubrícito (seta). F: Mielócito (cabeça de seta). G: Monócitos (setas). H: Adipócito (cabeça de seta). I: Plaquetas (seta). Método Giemsa. Objetiva 100x.....</p>	27
<p>Figura 2 – Fotografia do halo de células mononucleares (seta) da medula óssea de cutia.....</p>	28
<p>Figura 3 – Fotomicrografia de cultura de células aderentes de medula óssea de cutia em expansão. A: Primeira passagem, colônia mononuclear aderente (seta) circundada por uma monocamada celular aderente de morfologia fibroblastóide (cabeça de seta), objetiva 5x. B: Primeira passagem, morfologia fibroblastóide das células aderentes com projeções citoplasmáticas (seta), objetiva 40x. C: Primeira passagem, monocamada de células aderentes com uniformidade morfológica, esparsas células mononucleares aderentes (seta), objetiva 20x. D: Segunda passagem, predomínio de células aderentes de morfologia fibroblastóide (seta), objetiva 10x.....</p>	29
<p>Figura 4 – Fotomicrografia de cultura de células aderentes de medula óssea de cutia em expansão. A, B, C e D: terceira, quarta, sétima e oitava passagem, respectivamente. Manutenção predominante da morfologia fibroblastóide da cultura ao longo das sucessivas passagens. Objetiva 10x.....</p>	30
<p>Figura 5 – Representação gráfica da viabilidade celular (%) durante oito passagens em diferentes dias de cultura de células progenitoras aderentes de cutia.....</p>	31

RESUMO

Células-tronco possuem um grande potencial de auto-renovação e capacidade para diferenciar-se em células especializadas. O objetivo deste estudo foi identificar células da medula óssea de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), caracterizando-as morfológicamente, com foco nos progenitores hematopoéticos observados em extensões de medula óssea, e nos progenitores aderentes cultivados *in vitro* a partir da fração de células mononucleares com meio DMEM Low Glucose suplementado. Amostras de aspirado medular obtidas da crista íliaca foram utilizadas para preparação de lâminas histológicas através de esfregaços e amostras obtidas da tíbia foram submetidas a protocolos de isolamento, expansão, quantificação e congelamento celular. Observaram-se células hematopoiéticas em diferentes estágios de maturação (blastos e células comprometidas com as linhagens eritróide, mielóide e linfóide), megacariócitos maduros, plaquetas e adipócitos, não havendo diferenças qualitativas entre machos e fêmeas. A concentração celular total resultante do halo de células mononucleares foi de 1.10^8 células, semeados quatro poços com uma densidade de $2,5. 10^7$ células em placa de cultivo, observando-se posteriormente grandes *clusters* celulares, células aderentes de morfologia fibroblastóide e a organização de colônias das mesmas. Ao longo de 15 dias, o percentual de células mononucleares não aderentes reduziu progressivamente, e as colônias fibroblastóides formaram uma monocamada celular com 80% de confluência após 18 dias de cultivo. A monocamada constituiu-se a partir de células isoladas, freqüentemente fusiformes, mantendo contato através de prolongamentos citoplasmáticos, orientadas paralelamente entre si. Estas foram expandidas continuamente por oito passagens até a obtenção de 16 garrafas de cultivo, preservando a morfologia fibroblastóide. A viabilidade celular média foi de 96,07%. A partir da dissociação celular de 13 garrafas de cultivo de 25cm^2 conseguiu-se um pellet de $1,6. 10^7$ células progenitoras aderentes de medula óssea de tíbia de cutia. A criopreservação deste tipo celular foi realizada mantendo-se 14 criotubos, cada um contendo 1.10^5 cel/mL, em nitrogênio líquido. A medula óssea de cutia apresentou alta celularidade, houve considerável sucesso na obtenção de células mononucleares permitindo o isolamento, expansão, quantificação e congelamento de células aderentes fibroblastóides com características de células-tronco mesenquimais.

ABSTRACT

Células-tronco possuem um grande potencial de auto-renovação e capacidade para diferenciar-se em células especializadas. This study aims to identify bone marrow cells in agouti (*Dasyprocta prymnolopha*), characterizing morphologically them, focusing on hematopoietic progenitors observed in tracts of bone marrow and adherent progenitors cultured in vitro from the fraction of mononuclear cells in DMEM Low Glucose supplemented. Marrow aspirate samples were used to prepare slides and submitted to protocols as isolation, expansion, quantification and cell freezing. Hematopoietic cells were observed at different stages of maturation (blasts and cell committed to the erythroid, myeloid and lymphoid lineage), mature megakaryocytes, platelets and adipocytes, without qualitative differences between males and females. The total cellular concentration resulting of fraction of mononuclear cells were $1,10^8$ cells, initially seeded $2,5 \cdot 10^7$ into wells of a culture plate. Later we observe big clusters of cell in culture, adherent cells of fibroblastoid morphology and organizing them. Over 15 days, the percentage of non-adherent mononuclear cells decreased gradually, and the fibroblastoid colonies formed a monolayer with 80% of confluence after 18 days of culture. The monolayer was formed from single cells, often fusiform, maintaining contact through cytoplasmic extensions, oriented parallel to each other. The fibroblastoid cells were expanded continuously for eight passages until to obtain 16 bottles of cultivation, preserving the fibroblastoid morphology. The average of cell viability was 96.07%. We obtained a pellet of $1,6 \cdot 10^7$ adherent progenitor cells from bone marrow of the tibia of agouti from the cell dissociation of 13 bottles of cultivation of 25cm^2 . The cryopreservation of this cell type was performed by maintaining 14 cryovials, each one containing $1 \cdot 10^5$ cel/mL in liquid nitrogen. The bone marrow of agouti showed high cellularity, there was considerable success in obtaining cells mononuclareares allowing the isolation, expansion, freezing and quantification of adherent cells with fibroblastoid characteristics of mesenchymal stem cells.

1. INTRODUÇÃO

Células-tronco são definidas pela capacidade extensiva, ilimitada ou prolongada, de auto-renovação, e por originar pelo menos um tipo de descendente altamente diferenciado (FUCHS; SEGRE, 2000; WATT; HOGAN, 2000). O interesse neste tipo celular cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial na medicina regenerativa, como vem sendo demonstrado em inúmeros estudos clínicos e pré-clínicos (BARRY; MURPHY, 2004; HALE *et al.*, 2008).

No que se refere à classificação, considerando-se a maturação, as células-tronco podem ser de origem embrionária ou adulta (HERZOG; CHAI, KRAUSE, 2003), e de acordo com o seu potencial de diferenciação podem ser totipotentes (capazes de originar todas as células do indivíduo adulto, anexos embrionários e placenta), pluripotentes (capazes de originar todas as células do indivíduo), multipotentes (capazes de originar a vários tipos celulares de diferentes tecidos, mas em número limitado) e unipotentes (capazes de originar apenas um tipo celular específico) (JIANG *et al.*, 2002; SCHWINDT, BARNABÉ, MELLO, 2005).

Foram identificadas células-tronco adultas em diferentes tecidos de mamíferos (REYES *et al.*, 2001). Estas, contribuem naturalmente para a reposição de células perdidas por senescência celular normal ou lesão do tecido específico onde se encontram, como ocorre na pele, no epitélio intestinal e no sangue, que tem suas células constantemente destruídas e renovadas, num complexo e finamente regulado processo (ODORICO, KAUFMAN, THOMSON, 2001; HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003).

Existem algumas divergências relacionadas à plasticidade das células-tronco (QUESENBERRY *et al.*, 2004; ROMANO, 2004). Em suas “divisões assimétricas”, elas têm a habilidade de se proliferar repondo “o pool” de células-tronco, ou alternativamente se diferenciar em células especializadas por estímulos provindos de sinais liberados para ativar a expressão de genes de linhagens específicas (NARDI, 2005; ZAGO; COVAS, 2006). Ocorrendo ainda, normalmente, entre a célula-tronco e o seu descendente diferenciado terminal, populações de células progenitoras intermediárias comprometidas com o tipo específico celular, com limitada capacidade proliferativa e potencial de diferenciação restrito (WATT; HOGAN, 2000).

A medula óssea (MO) foi o local mais estudado durante muitos anos como fonte de células-tronco (PITTENGER *et al.*, 1999; NARDI; ALFONSO, 1999). No organismo adulto é capaz de produzir cerca de seis bilhões de células por quilograma de peso corporal por dia (KORBLING; STROV; CHAMPLIN, 2003), entre as quais estão incluídas as células-tronco

hematopoiéticas e mesenquimais que compõem as células mononucleares comumente utilizadas na aplicação em transplantes (MINGUELL; CONGET; ERICES, 2000). A quantidade de células precursoras presentes no total de células mononucleares garante parcialmente o sucesso do procedimento na reparação de lesões, levando-se em consideração a quantidade de células e o peso corporal do receptor (OLSSON et al., 2009).

Till e McCulloch (1961) demonstraram em seu experimento a reconstituição do sistema hematopoiético de camundongos que sofreram irradiação letal após o transplante de células da medula óssea de camundongos normais.

As células-tronco hematopoiéticas foram as primeiras a serem descritas (NARDI; ALFONSO, 1999), como formadoras dos diferentes tipos celulares sanguíneos, da linhagem mielóide, que inclui eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos, e da linhagem linfóide, que inclui linfócitos B, T e NK (WOGNUM; EAVES, THOMAS, 2003). Processo que ocorre de forma dinâmica, tanto em relação ao espaço, quanto ao tempo de desenvolvimento dos vertebrados (ORKIN, 1996, 2000).

A primeira onda de hematopoiese ocorre no saco embrionário, levando à produção dos primeiros constituintes sanguíneos, ainda nucleados (PERLINGEIRO, KYBA, DALEY, 2001; WANG et al., 2005). Em espécies como os ratos, a hematopoiese embrionária é transitória e ocorre entre o sétimo e décimo primeiros dias de vida (ORKIN; ZON, 2002). Extremamente rápida e com a função possibilitar o máximo de difusão de oxigênio para o embrião recém-formado, a hematopoiese embrionária passiva começa a diminuir à medida que uma via independente de hematopoiese intra-embriônica, “termo definitiva”, é iniciada passando a sustentar a produção de todas as linhagens de células do sangue para o feto, assim como para o indivíduo adulto (MEDVINSKY; DZIERZAK, 1999; SUGIYAMA; TSUJI, 2006).

Em outras experiências com ratos, resultados demonstraram que células-tronco hematopoiéticas originadas no desenvolvimento embrionário são capazes de originar outras linhagens de células, além das células do sangue. Como ocorre na relação entre a hematopoiese e o desenvolvimento vascular, quando uma translocação para determinados ambientes pode instruí-las a originar células específicas de outros tecidos (ORKIN; ZON, 2002). Nos ratos, células totipotentes, pluripotentes e diversos progenitores celulares têm sido amplamente estudados em cultura (EVANS; KAUFMAN, 1981; NAGY, 1990).

As células-tronco mesenquimais (CTM) presentes na medula óssea, foram primeiramente descritas em 1966 por Friedenstein e colaboradores, identificadas a partir das células

mononucleares de camundongo e denominadas células formadoras de colônia fibroblástica - CFU-F. As CTMs são um grupo de células clonogênicas (BIANCO; ROBEY, 2000; KORBLING; STROV; CHAMPLIN, 2003), presentes na medula óssea e em outros tecidos (JAVAZON et al., 2004), que proliferam *in vitro* como uma população heterogênea aderente ao plástico com morfologia semelhante ao fibroblasto (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970) e são capazes de se diferenciar em várias linhagens de células quando submetidas a diferentes estímulos apropriados (BYDLOWSKI, 2009), de origem mesodermal ou não mesodermal, tais como adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos, cardiomiócitos, células epiteliais e neurônios (LIU et al., 2009).

Geralmente consideradas como células multipotentes (JIANG et al., 2002), as CTMs tem potencial para se diferenciar em tipos celulares específicos, tais como: células maduras do coração, fígado, rins, pulmões, trato gastrointestinal, pele, ossos, músculo, cartilagem, gordura, endotélio e cérebro (KRAUSE, 2002). Comprovando que, quando submetidas a diferentes estímulos apropriados são capazes de se diferenciar em várias linhagens de células (BYDLOWSKI, 2009).

Na medula óssea elas fornecem suporte para células-tronco hematopoiéticas (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; BOCELLI-TYNDALL et al., 2007), apesar da frequência dessas células ser extremamente baixa, na proporção de uma em 220.000 células mononucleares (FALLA et al., 1993), sendo estimada em modelo murino uma célula-tronco mesenquimal numa faixa de 11.300 – 27.000 células nucleadas (MEIRELES; NARDI, 2003). Elas secretam uma série de citocinas e moléculas regulatórias implicadas em diferentes aspectos da hematopoese, e parecem modular o sistema imune. Devido a essas características, as CTM representam promissoras ferramentas para a terapia celular, sobretudo aquelas associadas ao transplante de medula óssea. Além disso, podem ser usadas para reduzir a proliferação de linfócitos e recentemente são expandidas *ex vivo* para tratar doença do enxerto contra o hospedeiro, demonstrando serem dotadas de propriedade imunossupressoras (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; BOCELLI-TYNDALL et al., 2007).

O sítio *in vivo* na medula óssea é desconhecido, no entanto, culturas de CTMs de medula óssea de ratos foram comparadas com as CTMs de medula óssea de humanos quanto ao perfil de expressão imunofenotípica e revelaram um grau elevado de concordância nos resultados entre as diferentes técnicas e espécies (WIECZOREK et al., 2003). Sendo, portanto, identificadas através de uma combinação de propriedades fenotípicas e funcionais definidas (JAVAZON et al., 2004).

Em linhas gerais, a Sociedade Internacional de Citoterapia estabeleceu requisitos mínimos para enquadrar populações celulares na categoria de CTM humanas, os quais seriam: plástica-aderência quando mantidas em cultura; expressão positiva para os marcadores CD 105, CD73 e CD 90 e negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19a ou CD79, ou moléculas de superfície HLA-DR; assim como sua capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*, promovendo uma caracterização mais uniforme e facilitando o intercâmbio de dados entre os pesquisadores (DOMINICI et al., 2006).

Quanto às células-tronco mesenquimais de outras espécies, a adesão e a diferenciação são as duas características principais entre os critérios-padrão, uma vez que a expressão de moléculas, como a superfície Ag em CTM murina, por exemplo, não são universalmente bem caracterizadas (TROPEL et al., 2004).

Técnicas de purificação e expansão em cultura de células-tronco mesenquimais da medula óssea de humanos têm sido desenvolvidas (JAISHWAL et al., 1997), seu uso terapêutico em seres humanos é recente e resultados alentadores são divulgados em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil (GALLIAN, 2005).

Frequentemente, as células-tronco mesenquimais não estão disponíveis em quantidade suficiente para restauração de órgãos e tecidos danificados, tornando-se necessária sua expansão *in vitro* (SENAGAGLIA et al., 2009). O potencial das células-tronco pode variar de acordo com o modelo experimental utilizado (WANG et al., 1993) e sua capacidade regenerativa tem sido um dos tópicos mais discutidos no mundo científico (CAMARGO; CHAMBERS; GOODELL, 2004).

Emergindo como uma alternativa na medicina regenerativa, área com foco no desenvolvimento de células, tecidos e órgãos com a finalidade de restaurar a função através do transplante (FODOR, 2003), as células-tronco podem proporcionar tratamentos terapêuticos para doenças e/ou lesões que medicamentos convencionais e novas drogas não podem tratar eficazmente (STRAUER; KORNOWSKI, 2003; McCULLOCH; TILL, 2005) e abrem perspectivas inovadoras quando aliadas à utilização de fatores de proliferação e diferenciação celular, ou biomateriais (SANTOS; SOARES; CARVALHO, 2004).

Além de poderem ser utilizadas em transplantes na terapia celular, as células cultivadas podem ser infectadas com vetores retrovirais e podem ser utilizadas na terapia gênica (KRAUSE, 2002). A cultura celular também é uma importante ferramenta para caracterizar eventos que ocorrem *in vivo*, identificar as bases genéticas e os processos fenotípicos envolvidos na

transformação celular, e comparar o comportamento coletivo de linhagens celulares normais (VILELA et al., 2003).

Células-tronco mesenquimais de ratos foram obtidas e propagadas *in vitro* a partir de diversos sítios do organismo adulto: cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas. Após serem analisadas, as células de diferentes culturas apresentaram perfis imunofenotípicos semelhantes, mas com certa heterogeneidade quanto aos marcadores de superfície, não parecem ser um parâmetro confiável para a análise da pureza das células em cultura (MEIRELES; CHAGASTELES; NARDI, 2006). De maneira geral, ainda não é possível suprir em laboratório todos os fatores extrínsecos gerados no nicho fisiológico de uma célula-tronco (MEIRELES *et al.* 2008).

O avanço na pesquisa básica é de fundamental importância para que estudos de novas técnicas de administração de células-tronco em humanos estejam embasados em modelos animais randomizados, controlados e duplo-cego (DOHMANN, 2004).

Segundo FAGUNDES & TAHA (2004) um modelo animal deve permitir o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal; possibilitar que um processo patológico espontâneo ou induzido possa ser investigado; e que um fenômeno, em um ou mais aspectos, seja semelhante ao fenômeno em seres humanos.

Nesse contexto, a busca por modelos biológicos adequados (KIM et al., 2002) tem se tornado cada vez mais importante, como forma de reproduzir resultados mais próximos possíveis do desejado, para aplicação tanto à medicina humana quanto à melhoria da qualidade de vida animal (LINDVALL; KOKAIA; MARTINEZ-SERRANO, 2004).

O conhecimento de aspectos biológicos e reprodutivos básicos de um animal e sua relação com outras espécies, além de melhorar o seu manejo produtivo e a sua exploração econômica, torna possível sua utilização como modelo experimental pelos pesquisadores (ALMEIDA et al., 2003).

Aproximadamente 90% do total das espécies utilizadas em laboratórios para pesquisa são animais de pequeno porte como o camundongo, rato, hamster, cobaio, ou o gerbil (FAGUNDES; TAHA, 2004). A cutia é um roedor de porte médio, que pertence à família Dasyproctidae, gênero *Dasyprocta*, seu tamanho varia em cerca de 50 cm de comprimento e 23cm de altura, com peso em torno de 2 a 3Kg. Distribui-se geograficamente desde a América Central até a América do Sul (DEUTSCH; PUGLIA, 1988), e vem sendo estudado morfológico (ASSIS-NETO et al., 2003; MENEZES et al., 2003; FORTES et al., 2005; PENNO et al., 2005; AZEVEDO et al.,

2008; OLIVEIRA et al. 2009a; OLIVEIRA et al., 2009b; MENEZES et.al., 2010; SOUSA, 2010; FERRAZ et al., 2011) e fisiologicamente (RIBEIRO et al, 2008a; RIBEIRO et al., 2008b; CAVALCANTE et al., 2005; ALMEIDA, 2009; MENEZES, 2010; FERRAZ, 2010).

Entre as espécies da fauna se apresenta como promissor animal para ser explorado zootecnicamente (HOSKEN; SILVEIRA, 2001) e como um possível modelo para pesquisas experimentais (BONATELLI et al., 2004; CABRAL et al., 2005).

Deste modo, mediante a possibilidade de verificar a plasticidade de progenitores celulares obtidos a partir de espécies selvagens prontamente disponíveis em cativeiro, buscamos verificar a viabilidade do compartimento basal medular de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), como fonte potencial de células-tronco. Considerando-se que muitas pesquisas com células-tronco têm sido realizadas usando modelos animais (BYDLOWSKI et al., 2009), o conhecimento da biologia destas células pode eventualmente se aplicar a medicina regenerativa, uma vez que a experimentação envolvendo células-tronco é fundamental (FODOR, 2003).

Visando alcançar novos conhecimentos dentro do estudo de células-tronco pelo uso de novos modelos animais, este estudo teve como objetivo identificar tipos morfológicos celulares componentes da medula óssea de cutias, com foco nos progenitores hematopoéticos observados em extensões de medula óssea e nos progenitores aderentes cultivados *in vitro* a partir da fração de células mononucleares. A realização de protocolos de isolamento, expansão, quantificação e congelamento celular permitem adquirir informações importantes para futuras pesquisas que contribuam para a utilização da cutia como modelo biológico em terapias celulares.

Este trabalho encontra-se estruturado da seguinte forma: introdução ao assunto pesquisado, seguida de um capítulo que discorre sobre a morfologia de tipos celulares encontrados na medula óssea e acerca de progenitores aderentes ao plástico obtidos de células mononucleares após cultivo celular, incluindo processos em laboratório de isolamento, expansão, quantificação e congelamento. O capítulo elaborado em forma de artigo científico de acordo com as normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira será submetido à publicação. O trabalho é finalizado com as considerações finais seguida da lista de referências bibliográficas utilizadas.

CAPÍTULO I*

* Apresentado segundo normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Morfologia de células da medula óssea de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), isolamento, expansão e quantificação de progenitores aderentes por meio de cultivo celular.

A. R. Rocha¹; F. R. Alves¹; M. A. M. Carvalho^{1,2*}

ABSTRACT Rocha, A.R., Alves, F. R. Alves, Carvalho, M. A. M. 2011 [**Morphology of bone marrow cells of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*), isolation, expansion, and quantification of adherent progenitors through cell culture**] Morfologia de células da medula óssea de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), isolamento, expansão e quantificação de progenitores aderentes por meio de cultivo celular. Stem cells are defined by the extensive capacity of self-renewal and originate at least one type of descendant highly differentiated. This study aims to identify bone marrow cells of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*), characterizing morphologically hematopoietic progenitors observed in tracts of bone marrow and adherent progenitors cultured in vitro from the fraction of mononuclear cells. Marrow aspirate samples were used to prepare squash slides and submitted to protocols as isolation, expansion, quantification and cell freezing. Hematopoietic cells were observed at different stages of maturation, mature megakaryocytes, platelets and adipocytes, without qualitative differences between males and females. The total cellular concentration of fraction of mononuclear cells was $1,10^8$ seeded into wells of a culture plate. We observe clusters of cell in culture, adherent cells of fibroblastoid morphology and organizing them, while the percentage of non-adherent mononuclear cells was reduced, the colonies formed a monolayer with 80% of confluence after 18 days of culture. The monolayer was formed from fibroblastoid cells, oriented parallel to each other. The fibroblastoid cells were expanded continuously for eight passages until to obtain 16 bottles of cultivation. The average of cell viability was 96, 07%. We obtained a pellet of $1, 6.10^7$ adherent progenitor cells from bone marrow of the tibia of agouti from the cell dissociation of 13 bottles of cultivation of 25cm^2 . The cryopreservation of this cell type was performed by maintaining 14 cryovials, each one containing 1.10^5 cel/mL in liquid nitrogen. The bone marrow of agouti presented high cellularity. There was considerable success in obtaining mononuclear cells allowing the isolation, expansion, quantification and freezing of adherent fibroblastoid cells that contain characteristics of mesenchymal stem cells.

INDEX TERMS: Sanity animal, Agouti, Bone Marrow, Adherent progenitors cells

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela,

² Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina-PI, Brasil, CEP:64049-550.*Autor para correspondência: mcelina@ufpi.edu.br

Morfologia de células da medula óssea de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), isolamento, expansão e quantificação de progenitores aderentes por meio de cultivo celular.

RESUMO Células-tronco são definidas pela capacidade extensiva de auto-renovação e por originar pelo menos um tipo de descendente altamente diferenciado. O objetivo deste estudo foi identificar células da medula óssea de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), caracterizando morfologicamente progenitores hematopoéticos observados em extensões de medula óssea e progenitores aderentes cultivados *in vitro* a partir da fração de células mononucleares. Amostras de aspirado medular foram utilizadas para preparação de lâminas histológicas e submetidas a protocolos de isolamento, expansão, quantificação e congelamento celular. Observou-se células hematopoiéticas em diferentes estágios de maturação, megacariócitos maduros, plaquetas e adipócitos, não havendo diferenças qualitativas entre machos e fêmeas. A concentração celular total do halo de células mononucleares foi de 1.10^8 semeada em poços de placa de cultivo, observando-se na cultura *clusters* celulares, células aderentes de morfologia fibroblastóide e a organização de colônias das mesmas, a medida que o percentual de células mononucleares não aderentes foi reduzido, as colônias formaram uma monocamada celular com 80% de confluência após 18 dias de cultivo. A monocamada constituiu-se a partir de células fibroblastóides, orientadas paralelamente entre si. Estas foram expandidas continuamente por oito passagens até a obtenção de 16 garrafas de cultivo. A viabilidade celular média foi de 96,07%. A partir da dissociação celular de 13 garrafas de cultivo de 25cm^2 conseguiu-se um pellet de $1,6.10^7$ células progenitoras aderentes de medula óssea de tibia de cutia. A criopreservação deste tipo celular foi realizada mantendo-se 14 criotubos, cada um contendo 1.10^5 cel/mL, em nitrogênio líquido. A medula óssea de cutia apresentou alta celularidade, houve considerável sucesso na obtenção de células mononucleares permitindo o isolamento, expansão, quantificação e congelamento de células aderentes fibroblastóides com características de células-tronco mesenquimais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cutia, medula óssea, cultura celular, células tronco, *Dasyprocta*

INTRODUÇÃO

A coleta de medula óssea é indicada visando o diagnóstico por meio de exame citológico (Grindem, Neel & Juopperi 2002) e para a obtenção de células pluripotentes no tratamento de doenças (Silva & Macedo 2006). O transplante de medula óssea realizado tradicionalmente é um procedimento no qual as duas técnicas são realizadas (Castro Jr, Gregianin & Bruneto 2001), e demonstra a integração da pesquisa laboratorial e clínica (Guarita-Souza, 2005).

Constituída de uma grande variedade de células, algumas de fácil caracterização, a medula óssea é composta por parênquima e retículo. O parênquima portador da função específica da medula óssea, representado pelos elementos medulares genuínos, produtores de grânulos vermelhos, granulócitos e plaquetas; e o retículo constitui o verdadeiro estroma da medula óssea, incluindo-se nele o sistema reticulo-histiocitário e o tecido linfóide. Podem aparecer em condições normais células atípicas que em número elevado referem-se a moléstias sistematizadas (Kastner 1972)

Entre a população celular da medula óssea são encontrados dois tipos de células-tronco: as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Minguell, Conget & Erices 2000). As células-tronco mesenquimais fazem parte do sistema estromal e tem como função principal fornecer suporte estruturo-funcional à hematopoiese (Bacigalupo 2004).

O número de células-tronco mesenquimais é extremamente baixo (Falla et al. 1993). Porém, estudos têm demonstrado que, dependendo de como estas células são aspiradas e manipuladas em cultura, pode ser possível aumentar essa frequência (Gronthos & Simmons 1996).

O avanço na pesquisa básica é de fundamental importância para que novas técnicas de administração de células-tronco em humanos estejam embasadas em modelos animais (Dohmann 2004). Nesse contexto, a busca por modelos biológicos adequados tem se tornado cada vez mais importante (Lindvall, Kokaia & Martinez-Serrano 2004). Sabe-se que roedores são bastante utilizados em laboratórios para pesquisa (Fagundes & Taha 2004).

A cutia, gênero *Dasyprocta*, é um roedor de porte médio, com tamanho variando em cerca de 50 cm de comprimento e 23 cm de altura, e peso em torno de 2 a 3Kg (Deutsh & Puglia 1988). Entre as espécies da fauna, apresenta-se como um possível modelo para pesquisas experimentais (Bonatelli et al. 2004; Cabral et al. 2005), pois é um animal que vem sendo bastante estudado (Assis-Neto et al. 2003, Menezes et al. 2003, Cavalcante et al. 2005, Fortes et

al. 2005, Penno et al. 2005, Azevedo et al. 2008, Ribeiro et al, 2008, Almeida 2009, Menezes et.al., 2010, Sousa, 2010, Ferraz et al. 2011) e que apresenta características biológicas favoráveis como a capacidade de se reproduzir em cativeiro, boa prolificidade, precocidade e domicilidade (Hosken 2001).

O objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia dos componentes celulares de medula óssea de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), com ênfase nos progenitores hematopoéticos e processos de isolamento, expansão, quantificação e congelamento de progenitores aderentes com características de células-tronco mesenquimais cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas oito cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), com idade entre um e três anos, sendo cinco machos e três fêmeas, provenientes do Núcleo de Estudos e Preservação de Animais Silvestres – NEPAS (Certificado de Registro IBAMA/PI N° 02/08-618) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Os animais foram previamente identificados, pesados e submetidos à exame clínico, perfil hematológico, avaliação física e diagnóstico gestacional por ultrassom. Consideraram-se aptos ao experimento, os animais que apresentavam diagnóstico de gestação negativo, normodipsia, normoúria, normotermia, normoquezia, normofonia cardíaca e perfil hematológico dentro dos padrões estabelecidos por Ribeiro *et al.* (2005). Os animais foram então alojados em gaiolas individuais de metal galvanizado medindo 100x60x40cm, no NEPAS da UFPI. Os animais foram alimentados com ração comercial (Proteína bruta mínima- 12%, Extrato Etérico- 1,5%, Matéria fibrosa-12%, Cálcio – 1,3% e Fósforo – 0,4%), além de milho, frutas e verduras regionais, e água *ad libitum*.

Todos os animais foram submetidos à coleta asséptica de medula óssea, utilizando-se agulha hipodérmica estéril 40x12 acoplada à seringa descartável de 5mL com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Amostras aspiradas da crista ilíaca esquerda de seis cutias (três machos e três fêmeas) foram utilizadas na confecção de lâminas com esfregaços do tipo squash, e amostras aspiradas das tíbias de duas cutias machos para a realização de cultivo celular. Os animais foram sedados (Cloridrato de Meperidina, Agribands[®]-5 mg/Kg/IM), posicionados em decúbito lateral e tricotomizada a região da crista. Realizou-se antisepsia (Álcool Iodado 1%. Impex[®]) de todo o membro pélvico esquerdo e procedeu-se bloqueio

anestésico (Cloridrato de Lidocaína sem vasoconstritor 2% solução injetável. Xylestesin[®], Cristália farma[®]-5 mg/Kg/SC) da região tricotomizada. Em seguida, a indução anestésica foi realizada (Associação de Cloridrato de Xilazina, Rompum[®], Bayer do Brasil[®]-1 mg/Kg/IM, e Cloridrato de Quetamina, Ketalar[®], Pfizer do Brasil[®]-40 mg/Kg/IM) e os animais foram mantidos em plano anestésico (Propofol 1%, Fresofol[®], Fresenius Kabi[®]-7 mg/Kg/IV) durante todo o procedimento de coleta.

Após esse procedimento, as cutias foram acompanhadas diariamente no NEPAS durante seis dias, realizando-se limpeza no local da punção com solução de Dakin (Hipoclorito de sódio 6%, bicarbonato de sódio 5%) e administração tópica de antibiótico e anti-inflamatório esteroidal (Cloridrato de oxitetraciclina e hidrocortisona, Terra-cortril[®], Pfizer do Brasil[®]) durante todo o período de observação.

As lâminas preparadas foram fixadas com álcool metílico por 10 minutos e corados por May-Grunwald Giemsa por 20 minutos. Após a confecção das lâminas histológicas, foram fotografados (Formato VGA, 1200 pixels) 10 campos aleatoriamente em objetiva de imersão, por meio de câmera digital (Sony DSC-W200, China) acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 200, Japan). As amostras de medula óssea foram analisadas quanto à morfologia celular, estado de maturação e diferenciação de células sanguíneas.

Os aspirados medulares destinados ao cultivo celular foram imediatamente transferidos para tubos de ensaio com EDTA e diluídos em solução salina-fosfato tamponante (PBS) estéril na proporção 1:1 e filtrada em equipo de transfusão, para remoção dos agregados celulares. Em seguida, o filtrado foi cuidadosamente depositado em tubo de centrífuga (Tubo Falcon[®] com capacidade de 15 mL - ACQuímica[®]) 7 mL de solução de Ficoll (Ficoll Histopaque, SIGMA[®] do Brasil) e centrifugado a 2000 rpm por 25 minutos a 20°C, visando a separação dos constituintes por gradiente de densidade. O halo esbranquiçado rico em fração mononuclear foi aspirado com pipetador automático (Houston[®]) o halo esbranquiçado e uma pequena fração de plasma com células mononucleares, sendo imediatamente diluídos em PBS estéril para lavagem celular e re-centrifugados por 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o novo *pellet*, ressuspendido em 14 mL de meio de crescimento Dulbecco's Modified Eagle's (D-MEM) completo (Invitrogen[®] baixa glicose, contendo 3,7 g/l de bicarbonato de sódio e 10-15 mM HEPES, pH 7,5, 15% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina, 1% de L-glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais) para realização da avaliação de viabilidade celular.

Uma alíquota de 50µL desta solução foi diluída em 50µL de corante Azul de Tripán 0,2% e homogeneizada num frasco de vidro esterilizado. Desta solução foi retirada uma alíquota para contagem celular em câmara de Neubauer, por meio da seguinte fórmula (Meirelles & Nardi 2003, Bittencourt *et al.* 2006):

$$\text{Concentração celular} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{números quadrantes da câmara}} \times 10^4 * \times \text{fator de diluição} \times \text{volume total da solução}$$

*Fator de correção da câmara de Neubauer (10^3) x Espessura da lamínula (10).

Foram contadas as células coradas em azul, para avaliação da viabilidade e as células não coradas, para avaliação da concentração celular. Após estas avaliações, semeou-se quatro poços de uma placa de cultivo celular (Placa de crescimento celular de seis poços TPP[®]) na densidade de $2,5 \cdot 10^7$ células/poço em 3,5mL de meio de cultivo DMEM Low Glucose contendo 15% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Corporation), 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-Glutamina e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina), mantidos em estufa incubadora (TECMAL TE-399[®]) à 37°C em 5% de CO² e umidade de 95%.

Os poços da placa de cultivo celular foram lavados duas vezes com solução de PBS com 1% de antibiótico (Penicilina-estreptomicina. SIGMA[®] do Brasil) a cada três dias, seguido da troca completa do meio de cultivo celular, durante 18 dias, período no qual as culturas dos poços atingiram 80% de confluência. Nesse momento, os poços de cultura foram submetidos à tripsinização com um mL de tripsina 1x (Solução de Tripsina-EDTA 10x, frasco com 100 mL. SIGMA[®] do Brasil) e incubada a 37 °C durante cinco minutos. Após esse período, inativou-se a ação da tripsina com acréscimo de meio D-MEM Low Glucose suplementado. A solução foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada (Citocentrífuga de bancada FANEM MOD.280[®]) à temperatura de 20°C e 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado, o *pellet* ressuspenso em três mL de D-MEM completo e realizado nova contagem celular. Posteriormente, plaqueou-se 10^6 células/mL/poço em uma placa de cultura de seis poços e novamente mantida em incubação.

Os poços de cultivo continuaram sendo lavados com solução de PBS com 1% de antibiótico e o meio de cultivo, substituído a cada três dias, por 10 dias consecutivos.

Após este período, as culturas dos poços atingiram confluência de 80% e foi realizada a tripsinização, contagem e repique destas células, em concentração de 10^6 células/mL, para quatro

garrafas de cultura de tecidos (TPP[®]) de 25cm². As culturas foram expandidas, fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase (COLEMAN NIB-100[®]) e repicadas com o dobro da área original, aferindo-se a concentração celular a cada passagem, até a obtenção de 16 garrafas de cultivo.

Após obter-se confluência de 80%, as culturas foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e ressuspendidas em 14 criotubos resfriados a 4°C contendo meio de congelamento (50% de D-MEM[®] High glicose, Cat. n° 10313-039, Invitrogen[®]), suplementado com 40% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen[®], Cat. n° 16000-044), 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Vetec-cat[®]. Cat. n° 590) e 1% de antibióticos (Invitrogen[®], Cat. n° 15140-122). Os criotubos permaneceram em freezer a - 80°C *overnight* durante 48 horas e posteriormente foram armazenados em botijão contendo nitrogênio líquido.

A metodologia utilizada no estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), segundo o parecer n° 006/09, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO - ICMBio/IBAMA, n°. 19254-1.

RESULTADOS

A medula óssea da cutia apresentou alta celularidade. Identificaram-se diferentes tipos celulares em diferentes estágios de maturação, não havendo diferenças qualitativas entre machos e fêmeas.

As células precursoras de menor grau de diferenciação na escala evolutiva, das linhagens eritróide, mielóide e linfóide (Figura 1A), mostraram-se indistinguíveis morfológicamente. Estas, representadas pelos rubroblastos, mieloblastos e linfoblastos foram observadas como células de diâmetro quatro vezes superior ao de um eritrócito maduro, de alta relação núcleo-citoplasma, núcleo redondo, cromatina frouxa e pontilhada, citoplasma intensamente basofílico e ausência de grânulos citoplasmáticos. As demais células medulares foram identificadas e classificadas de acordo com o comprometimento evolutivo das mesmas.

As células linfóides identificadas foram os prolinfócitos (Figura 1B), linfócitos grandes e pequenos. Os prolinfócitos possuíam pequena relação núcleo-citoplasma, núcleo central, estriado, com cromatina frouxa, nucléolos evidentes e citoplasma basofílico. Os linfócitos

grandes e pequenos foram observados como células menores que os prolinfócitos, mas de características similares, os quais diferiram entre si pela maior relação núcleo-citoplasma do primeiro.

As células monocíticas observadas foram os promonócitos (Figura 1C) e monócitos. Os primeiros possuíam diâmetro três vezes superior ao de um eritrócito adulto, núcleo central, irregular, por vezes edentado, cromatina frouxa, nucléolos evidentes, elevada relação núcleo-citoplasma e discreta basofilia citoplasmática. Os monócitos observados eram ligeiramente menores que seu antecessor, mas com as mesmas características morfológicas.

Para a linhagem eritróide, identificou-se prorrubríctos, rubríctos (Figura 1D), metarrubríctos (Figura 1E), eritrócitos policromatofílicos e eritrócitos maduros. Os prorrubríctos apresentaram-se como células similares ao rubroblastos, porém de menor diâmetro, citoplasma mais abundante e discretamente basofílico, núcleo redondo e cromatina grosseira. Os rubríctos foram observados como células menores que seu antecessor, núcleo pequeno, denso, de cromatina grosseira, baixa relação núcleo-citoplasma e policromatofilia citoplasmática. Analogamente, os metarrubríctos apresentaram as mesmas características morfológicas, contudo com relação núcleo-citoplasma ainda menor, maior intensidade de policromatofilia citoplasmática, núcleo mais denso, porém lateralizado. Os eritrócitos policromatofílicos foram observados como células anucleadas, de diâmetro ligeiramente superior a um eritrócito adulto e de citoplasma policromatofílico. Os eritrócitos maduros foram as menores células observadas, anucleados, com halo central pálido e citoplasma de coloração vermelho-alaranjada.

As células mielóides identificadas foram promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes neutrófilos, neutrófilos segmentados (Figura 1F), eosinófilos (Figura 1F) e basófilos. Os promielócitos foram observados com diâmetro menor que os mieloblastos, núcleo central, cromatina puntiforme e frouxa, citoplasma mais abundante e discretamente basofílico, com grânulos citoplasmáticos policromatofílicos. Os mielócitos (Figura 1G) apresentaram-se com tamanho inferior ao seu antecessor, núcleo grande, oval e edentado, pequena relação núcleo:citoplasma, discreta basofilia citoplasmática com presença de grânulos, que variavam em tons acidofílicos e basofílico dentro desta mesma população celular. Os metamielócitos observados possuíam núcleo riniforme, cromatina estriada, frouxa e citoplasma de características similares aos mielócitos. Analogamente, os bastonetes neutrófilos apresentavam núcleo riniforme, pequena relação núcleo:citoplasma e citoplasma discretamente basofílico, sem

granulações aparentes. Os neutrófilos segmentados foram observados como células com o dobro do diâmetro de um eritrócito adulto, núcleo com mais de duas segmentações, de cromatina densa e grosseira e citoplasma discretamente basofílico, também sem granulações aparentes. Os eosinófilos e basófilos possuíam morfologia similar aos neutrófilos, contudo eram evidentes granulações citoplasmáticas grosseiras de coloração acidófila e púrpura, respectivamente.

Na linhagem megacariocítica foram identificados apenas megacariócitos maduros e plaquetas (Figura 1H). Os primeiros apresentavam diâmetro três vezes superior ao de um linfoblasto ou mieloblasto, elevada relação núcleo:citoplasma, núcleo multilobulado, cromatina estriada, frouxa e citoplasma profundamente basofílico. As plaquetas foram observadas como estruturas com um terço do diâmetro de um eritrócito adulto, anucleadas e discretamente basofílicas.

Observou-se ainda grande percentual de adipócitos (Figura 1I) nas amostras analisadas. Estes se apresentaram como células grandes, não coradas em seu interior e inúmeros vacúolos acompanhando a margem citoplasmática.

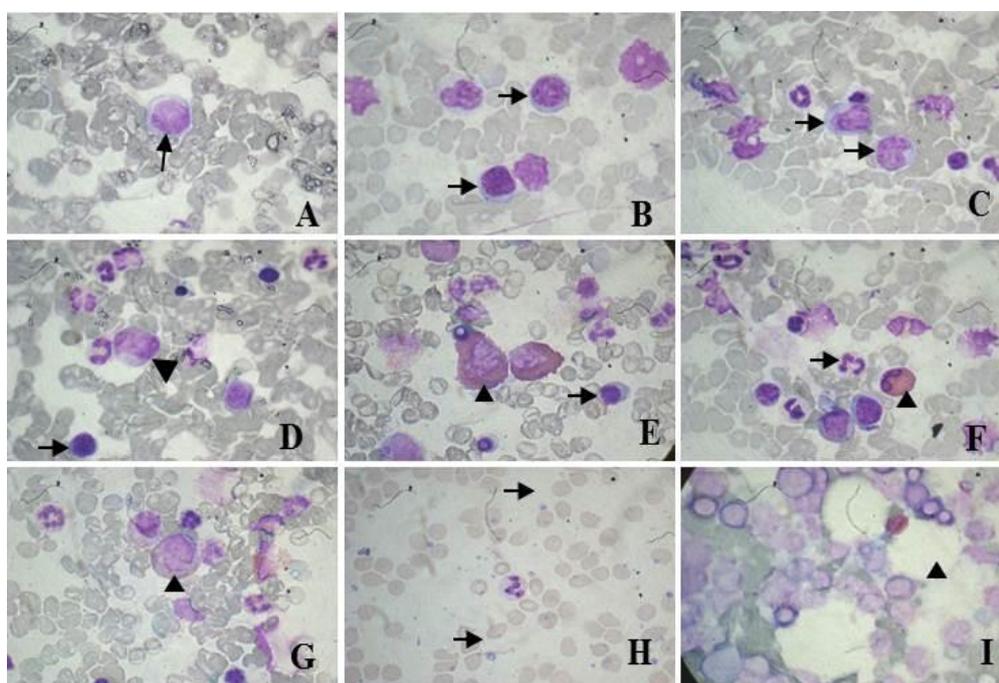


Figura 1: Fotomicrografias de extensão da medula da cutia. A: Precursor de linhagem mielóide ou linfóide (seta). B: Prolinfócitos (setas). C: Monócitos (setas) D: Rubrícito (seta) e promonócito (cabeça de seta). E: Promielócito (seta) e metarrubrícito (seta). F: Neutrófilo segmentado (seta) e eosinófilo (cabeça de seta). G: Mielócito (cabeça de seta). H: Plaquetas (setas). I: Adipócito (cabeça de seta). Método Giemsa. Objetiva 100x.

Conseguiu-se na primeira coleta 1,5mL de aspirado medular da tíbia de cutia, do qual as células mononucleares foram semeadas em duas placas de cultivo e observadas em microscópio de luz invertida durante o período de quatorze dias, mas não expandiram o suficiente para a manutenção da cultura celular. Na segunda coleta, foram preparados com 6,5mL de aspirado medular das tíbias direita e esquerda, em dois tubos falcon de 15mL, solução de 3,5mL de aspirado medular diluída em 3,5mL de solução tamponada salina colocada lentamente sobre 7mL de solução Ficol Histopaque.

O halo de células mononucleares (Figura 2) da medula óssea obtido após separação por gradiente de densidade localizou-se na interface entre a solução Ficol Histopaque na parte inferior e o plasma na parte superior, observando-se um anel celular com aspecto de névoa.

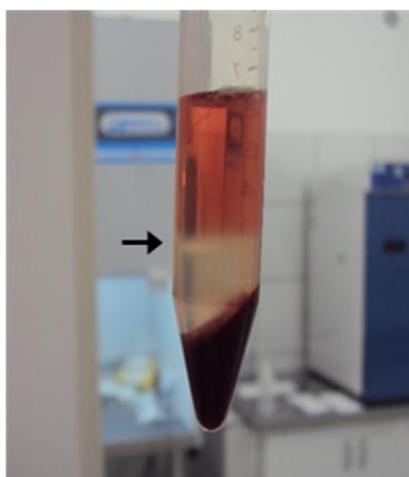


Figura 2. Fotografia do halo de células mononucleares (seta) da medula óssea de cutia.

A coleta da fração mononuclear, após centrifugação, da amostra de medula óssea revelou elevada celularidade, com concentração de 10^8 células mononucleadas/mL. Estas apresentavam-se em grandes *clusters* celulares (Figura 3), com sobreposição celular, limites citoplasmáticos bem definidos e núcleo evidente.

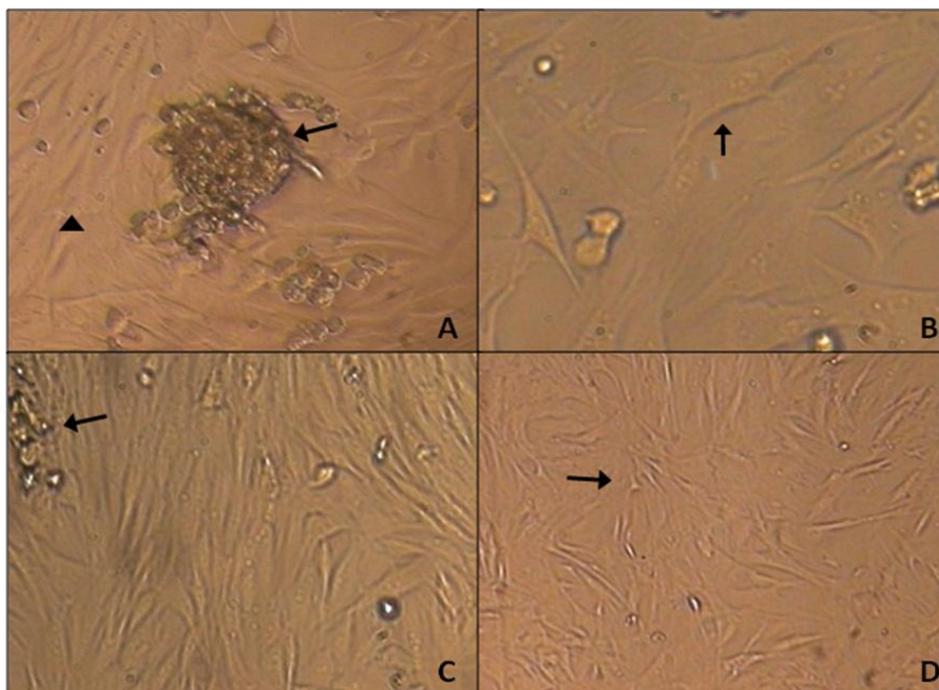


Figura 3. Fotomicrografia de cultura de células aderentes de medula óssea de cutia em expansão. A: Primeira passagem, colônia mononuclear aderente (seta) circundada por uma monocamada celular aderente de morfologia fibroblastóide (cabeça de seta), objetiva 5x. B: Primeira passagem, morfologia fibroblastóide das células aderentes com projeções citoplasmáticas (seta), objetiva 40x. C: Primeira passagem, monocamada de células aderentes com uniformidade morfológica, esparsas células mononucleares aderentes (seta), objetiva 20x. D: Segunda passagem, predomínio de células aderentes de morfologia fibroblastóide (seta), objetiva 10x.

As primeiras células mononucleares aderentes foram observadas após 24 horas de cultivo e o início da organização das colônias das mesmas, após 48 horas de cultivo. Grande percentual de células mononucleares permaneceu em suspensão até a primeira lavagem com PBS, após 72 horas de cultivo. Após esta lavagem, com redução significativa das células em suspensão, foram observadas as primeiras colônias de células progenitoras, de morfologia fibroblastóide e aderentes.

No decorrer das sucessivas lavagens, ao longo de 15 dias, o percentual de células mononucleares em suspensão e aderidas reduziu progressivamente, até que apenas colônias de células progenitoras foram observadas. Estas coalesceram e formaram uma monocamada celular com 80% de confluência após 18 dias de cultivo.

A monocamada celular constituiu-se a partir de células isoladas, de tamanho grande e achatadas, frequentemente fusiformes, proliferando e mantendo contato umas com as outras, com prolongamentos citoplasmáticos orientados paralelamente entre si. Estas foram expandidas continuamente por oito passagens até a obtenção de 16 garrafas de cultivo e preservaram a morfologia fibroblastóide observada no isolamento da cultura (Figura 4).

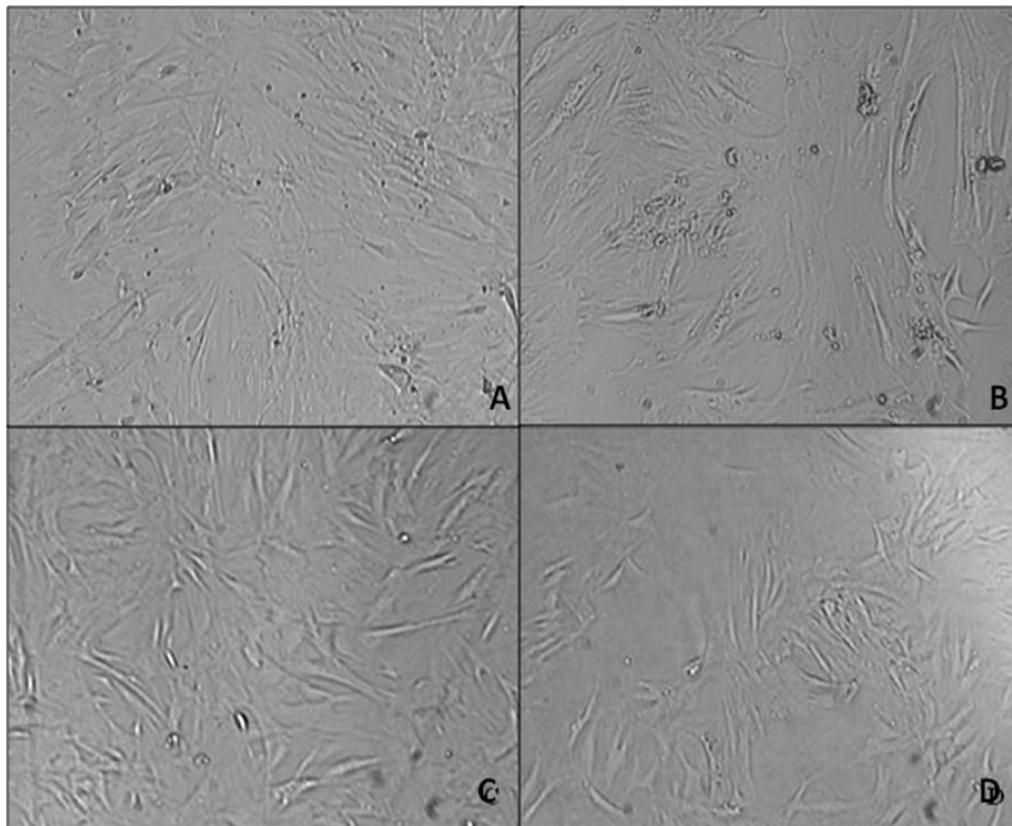


Figura 4: Fotomicrografia de cultura de células aderentes de medula óssea de cutia em expansão. A, B, C e D: terceira, quarta, sétima e oitava passagem, respectivamente. Manutenção predominante da morfologia fibroblastóide da cultura ao longo das sucessivas passagens. Objetiva 10x.

Observou-se uma viabilidade celular de 99,57% no momento da coleta da medula óssea, e esta se manteve, ao longo de todas as passagens em média 96,07% (Figura 5).

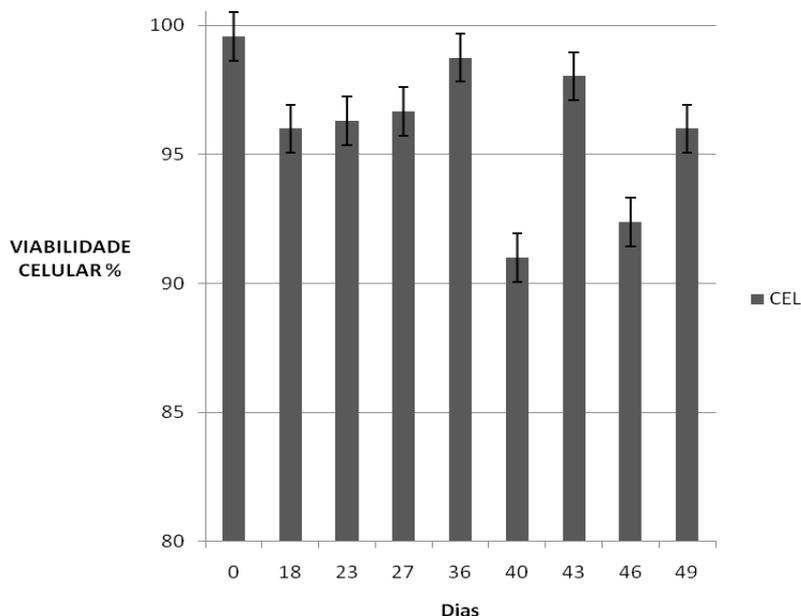


Figura 5. Representação gráfica da viabilidade celular (%) durante oito passagens em diferentes dias de cultura de células progenitoras aderentes de cutia.

A partir da dissociação celular com Tripsina-EDTA de 13 garrafas de cultivo de 25cm² conseguiu-se um pellet de 1,6.10⁷ cel/mL de células progenitoras aderentes de medula óssea de tibia de cutia. A criopreservação deste tipo celular foi realizada mantendo-se 14 criotubos, cada um contendo 1.10⁵ cel/mL, em nitrogênio líquido.

DISCUSSÃO

Nas extensões de medula óssea analisadas, foram observadas células sanguíneas em diferentes estágios de maturação e células estromais (células reticulares, macrófagos, fibroblastos, adipócitos), conforme observado em medula óssea de ratos (Weiss 1976). No que se refere à caracterização das células do sistema hematopoiético de cutias, as informações reduzem-se às características morfológicas e morfométricas de células sanguíneas especializadas do sangue periférico (Conde Júnior 2008).

Não foram identificados todos os estágios de maturação celular, dentre as diferentes linhagens observadas, nas amostras coletadas. Este fato já havia sido observado, em análises de medula óssea murina, por Weiss & Geduldig (1991), os quais referiram que alguns tipos

celulares são restritos a determinados lócus do compartimento medular ósseo, a fim de impedir a liberação irrestrita de células medulares imaturas. Possivelmente, algumas linhagens celulares tenham permanecido associadas ao estroma adjacente medular, impedindo sua visualização nos esfregaços analisados. Neste caso, são necessárias futuras análises histológicas da medula óssea de cutias para elucidar esta questão.

Além disso, a impossibilidade de identificação de alguns tipos celulares blásticos provavelmente deve-se às características morfológicas compartilhadas entre eritroblastos, monoblastos e linfoblastos neste período evolutivo. Esta observação corrobora com os relatos de Knowles (1986), Coofnan (1982) Fleming (1993) e Kina et al. (2000) os quais inferem que a análise histoquímica, em murinos, permite a identificação destes tipos celulares.

Ainda que, células das linhagens eritróide, mielóide, linfóide, megariocítica e monocítica das medulas ósseas analisadas, apresentem grande similaridade morfológica com estas linhagens correspondentes em humanos (Lorenzi et al., 2003; Bain, 2004). Estas células são identificadas comumente mais por aspectos funcionais do que morfológicos por meio de antígenos de superfície (Zago & Covas, 2006)

Possivelmente, a similaridade morfológica dentre as células do presente trabalho com as células de linhagens correspondentes de outros roedores silvestres, corresponda à similaridade fisiológica dentre as mesmas. Caso esta asserção seja confirmada, o modelo biológico de medula óssea da cutia poderá ser validado como um modelo murino alternativo às espécies comumente utilizadas experimentalmente. Analogamente, devido às similaridades morfológicas com células derivadas da medula óssea de humanos, a cutia poderá ser utilizada como modelo para estudo de discrasias medulares. Para tanto, são necessários estudos de histoquímica e imunoenaios para esclarecer esta teoria.

A elevada concentração celular aferida no isolamento da fração mononuclear da medula óssea já havia sido observada por Muschler *et al.* (1997); Meirelles & Nardi (2003); Belardineli *et al.* (2008); Olsson *et al.* (2008); Tognoli *et al.* (2008); Oliveira *et al.* (2010). Estes autores obtiveram concentrações entre 10^5 a 10^8 células/mL, em um volume de oito mL de aspirado medular, e relataram que a concentração celular é diretamente proporcional ao volume coletado, desde que não haja a formação de coágulos. No presente trabalho, obteve-se uma concentração de 10^8 células/mL em seis mL de sangue medular, o que permite-nos inferir que o modelo proposto para coleta de medula óssea em cutias é viável.

Além disso, obteve-se uma viabilidade celular de 96,97% no momento da coleta da medula óssea, corroborando com os relatos de Meirelles & Nardi (2003), os quais referem ser necessário uma viabilidade acima de 90% para se iniciar o isolamento de células progenitoras.

Quando em cultura, uma pequena proporção de células mononucleares coletadas formaram colônias aderentes, de forma desorganizada e com sobreposição celular, enquanto havia uma grande proporção de células mononucleares em suspensão. Estes achados corroboram com as observações de Vituri *et al.* (2008), os quais descrevem que apenas macrófagos e algumas células do sistema retículo endotelial da medula óssea, possuem a capacidade de aderir-se em substrato plástico. Segundo Klein *et al.* (1995), integrinas liberadas pela matriz extracelular podem interferir em eventos como adesão celular, migração e proliferação de diferentes células. Giancotti e Ruoslahti (1999) afirmam que estes processos biológicos, assim como a transdução de sinais, a apoptose e a metáfase, são fortemente influenciadas por interações célula-células e célula-matriz extracelular adjacente, pois geralmente estes processos adesivos inibem a apoptose. Gu *et al.* (2003) cita a fibronectina e a laminina como principais proteínas transmembranas que atuam na adesão celular, a laminina promove ainda a migração celular interferindo na determinação de células que permanecem na cultura.

Embora não tenha sido realizada imunofenotipagem das células mononucleares, acreditamos que as células em suspensão fossem representadas por linfócitos, megacariócitos e mielócitos em geral. Segundo Soleimani & Nadri. (2009) as células mononucleares em cultura que não eram aderentes de morfologia fibroblastóide, após sucessivas lavagens, foram retiradas das garrafas de cultivo. Estas células fibroblastóides permaneciam e organizavam-se em colônias que coalesciam até formar uma monocamada celular aderente. Durante expansão contínua, estas células preservaram a morfologia inicialmente observada, de acordo com Meirelles & Nardi (2003), Monteiro *et al.* (2009), os quais relatam que as células progenitoras da medula óssea possuíam aderência ao plástico, a morfologia fibroblastóide e a formação de colônias observadas em cutias são características atribuídas às células-tronco mesenquimais isoladas de outros animais como o

O comportamento celular observado nas culturas da presente pesquisa sugere a presença de progenitores celulares com capacidade para expandir-se continuamente e preservarem-se indiferenciados, características esperadas para as células-tronco e que devem ser confirmadas por métodos de imunofenotipagem (Horwitz *et al.* 2005, Dominici *et al.* 2006).

Estudos *in vitro*, demonstram que a capacidade proliferativa é significativa, embora, varie com as condições de culturas utilizadas. Estudos com CTMs de ratos mostraram que continuam proliferando durante vinte e seis subculturas (Friendstein, 1976). Enquanto Jiang et al., 2002, observou populações de células-tronco mesenquimais obtidas de ratos duplicarem-se até mais de 120 vezes. Tropel et al. (2009) obteve CTMs purificadas da medula óssea do rato adulto cuja população celular fibroblastóides em crescimento constituía-se principalmente por células fusiformes e estreladas com capacidade de renovação significativa, cultivadas até 30 passagens. De igual modo, as células progenitoras de cutia expandiram-se continuamente mantendo a morfologia indiferenciada.

Presentes na medula óssea e em muitos outros tecidos, as propriedades fenotípicas e funcionais das CTMs (Javazon et al. 2004), permitiram que fossem isoladas de diversas espécies: ratos (Wakitani, Saito, Caplan 1995), camundongos (Pereira et al. 1995), cães (Kadiyala et al. 1997), humanos (Pittenger et al. 1999), babuíno, porco, ovelhas, cabras, coelhos (Mosca et al. 2000), gatos (Martin et al. 2002).

Apesar de identificado o comportamento biológico inerente a uma célula-tronco adulta nas culturas do presente trabalho, não foi realizada a caracterização das mesmas, nem induzida diferenciação. Este fato deve-se ao ineditismo da pesquisa, uma vez que não existem dados científicos sobre as células progenitoras da medula óssea da cutia. Não obstante, todos os protocolos de cultivo, expansão e caracterização destas células continuam sendo estabelecidos pelos autores deste trabalho, de forma que serão publicados a posteriori, quando houver dados científicos precisos para tal. As células progenitoras aderentes de cutia congeladas permitem futuros bioensaios na pesquisa acerca da biologia destas células e no seu potencial terapêutico.

CONCLUSÕES

A colheita de aspirado medular proporcionou a obtenção de um botão celular com alta celularidade, componentes da medula óssea de cutias puderam ser observados e descritos morfológicamente através de extensões, visualizando-se tipos celulares comuns do compartimento medular, inclusive progenitores hematopoéticos menos diferenciados (blastos) e outros em estágios de maturação mais desenvolvidos. O halo de células mononucleares pôde ser coletado depois de separação por gradiente Ficoll-Histopaque revelando que células progenitoras aderentes ao plástico permaneceram na cultura compartilhando características de células-tronco

mesenquimais, ou seja, expandindo-se e mantendo morfologia fibroblastóide com elevada viabilidade celular.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro (processo: 308275/2008-0) á pesquisa.

REFERÊNCIAS

Almeida H.M. 2009. **Parâmetros morfofisiológicos da reprodução de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766) em cativeiro: análise colpocitológica, morfométrica e concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol, por enzima imunoensaio, durante o ciclo estral.** Teresina, 2009, 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí. 2009.

Assis-Neto A.C. et al. 2003. Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** 40.

Azevedo L.M. et al. 2008. Distribuição intraparenquimal da artéria hepática em cutias (*Dasyprocta sp*, *Rodentia*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v. 45:1: 5-10.

Bacigalupo A. 2004. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. **Best Practice & Research Clinical Haematology.** 17: 387-399.

Belardinelli M. C. et al. 2008. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. **Toxicology.** 247: 1-5.

Bain J. 2004. **Células sanguíneas: um guia prático.** Porto Alegre: Ed. Artmed. 2004.

Bittencourt R. A. C et al.2006. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortop Bras.** 14(1).

Bonatelli M. et al. 2004. South America Hystricomorph rodents as reproductive models. **Braz Coll of Anim Reproduc.** 1:168.

Cabral R. et al. **Roedor silvestre como modelo experimental para estudos de lesões renais e aplicabilidade em terapia celular.** In: 4º Simpósio de Células-tronco e terapia celular e gênica da UNIFESP, 2010, São Paulo. 4º Simpósio de Células-tronco e terapia celular e gênica da UNIFESP - 10 e 11 junho de 2010. São Paulo : UNIFESP, 2010. p. 17-17.

Castro Jr, C.G.; Gregianin, L.J.; Brunetto, A.L. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **Jornal de Pediatria.** vol. 77, nº5, 2001.

Cavalcante R. R. C. Digestibilidade aparente de nutrientes de rações balanceadas com alimentos alternativos para cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) em crescimento. **Ciência Animal Brasileira**. 6:163-171. 2005.

Conde Júnior A. M. **Morfologia e morfometria das células do sangue periférico de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831)**, 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Piauí, 2008.

Coffman R.L. 1982. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. **Immunology**. Rev. 69:5-23.

Deutsh L. A. & Puglia L. R. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988.

Dohmann H.F.R. 2004. Pesquisa Básica na Terapia Celular - Luxo ou Necessidade? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 83:275-277.

Dominici M. et al. 2006. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 8:315-317.

Fagundes D.J. & Taha M.O. 2004. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 19.

Ferraz M. S. et al. 2011. Collection and evaluation of epididymal spermatozoa in agoutis (*Dasyprocta aguti*) raised in captivity. **Theriogenology**. 75: 459-462.

Fleming W.H. et al. 1993. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo (growth factors/bone marrow transplantation/peripheral blood stem cells). **Proceedings of the National Academy Sciences**. 90:3760-3764.

Friendstein A.J., Gorskaja J.F. & Kulagina N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**. 4:267-274.

Fortes E.A.M. et al. 2005. Aspectos morfológicos da tuba uterina de cutias (*Dasyprocta aguti*, Mammalia: Rodentia). **Brazilian Journal Research animal Science**. 42:2:135-142.

Giancotti F.G & Ruoslati E. 1999. Integrin signaling. **Science**. 285:1028-1032.

Grindem C. B., Neel J. A. & Juopperi T. A. 2002. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinical Small Animal** 32:1313-1374.

Gronthos S. et al. 2003. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**. 116:1827-1835.

Guarita-Souza L.C. et al. 2005. A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal Cardiology Surgery**. p. 270-278.

- Gu Y. et al. 2003. Hematopoietic Cell Regulation by Rac1 and Rac2 Guanosine Triphosphatases. **Science**. 302:445-449.
- Horwitz E.M. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 7:393 - 395.
- Hosken, F.M. & Silveira, A.C. 2001. **Criação de cutias**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil (Coleção Animais Silvestres, v. 4), 2001.
- Javazon E.H. et al. 2001. Rat Marrow Stromal Cells are More Sensitive to Plating Density and Expand More Rapidly from Single-Cell-Derived Colonies than Human Marrow Stromal Cells. **Stem Cells**. 19:219-225.
- Jiang Y. et al. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**. 418:41-49.
- Kadiyala S. et al. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplantation**. 6:125-134.
- Kastner M.R.Q. 1972. Estudo dos elementos celulares na medula humana de adultos I. Linhagem plasmocitária. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 70 (3)
- Kina et al. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the later stages of murine erythroid lineage 2000. *Br. J. Haematol.* 109:280-287
- Klein G. 1995. **The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment**. Cellular and Molecular Life Sciences. **51:914-926**.
- Knowles D.M. 1986. The human T-cell leukemias: clinical, cytomorphologic, immunophenotypic, and genotypic characteristics. **Human pathology**, 17:14-33, 1986.
- Lindvall O., Kokaia Z. & Martinez-Serrano A. 2004. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders- how to make it work. **Nature Medicine**. 10:42-50, 2004.
- Lorenzi T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 655 pag.
- Martin D.R. et al. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**. 30:879-886.
- Meireles L.S. & Nardi N.B. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Hematology**. 123:702-711.
- Menezes D.J.A. et al. 2010. Morfologia of the male agouti accessory genital glands (*Dasyprocta prymnolopha*. Wagler, 1837). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30:793-797.

- Menezes D.J.A. et al. 2003. Morfologia dos órgãos genitais externos do macho de cutia (*Dasyprocta aguti*. Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 40:148-153.
- Minguel J.J. Conget P. & Erices A. 2000. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33:881-887.
- Monteiro B.S.M., Argolo Neto N.M., & Del Carlo R.J. 2009. Células-tronco mesenquimais: uma breve revisão. *Ciência Rural*.
- Mosca J.D. et al. 2000. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. 379:71-90.
- Mushler G. F., Boehm C. & Easley K. 1997. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*.79:1699-1709.
- Oliveira G. K. et al. 2010. Células tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 62:72-79.
- Olsson D.C. et al. 2008. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**. 38:2403-2412.
- Penno A.K. et al. 2005. Lobação, ramificação brônquica e distribuição arterial no pulmão da cutia (*Dasyprocta* sp., Mammalia - Rodentia). **Brazilian Journal veterinary Research animal Science**. São Paulo, v. 42, n. 5, p. 331-336, 2005.
- Pereira R.F. et al. 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting recursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 92:4857-4861.
- Pittenger M.E. et al. 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**. 284:143-147.
- Ribeiro E.E.A. et al. 2008. Hemograma e proteinograma de cutias (*Dasyprocta* sp.) hípidas, criadas em cativeiro: influência do sexo e da idade. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. v.60, n.5, p.1123-1127, 2008.
- Silva R.L. & MACEDO M.C.M.A. 2006. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas sem uso de hemocomponentes. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*.2:153-156.
- Soleimani M. & Nadri S. 2009. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. **Nature Protocols**. 4: 102-126.

Sousa F.C.A. 2010. **Determinação dos parâmetros ultrassonográficos para avaliação gestacional de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831)**. Teresina, 2010, 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí.

Tognoli G.K. Autotransplante da fração mononuclear da medula óssea em úlcera corneana por hidróxido de sódio experimental em cães. 2008. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria.

Vituri C.L. et al. 2008. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides *in vitro* no modelo de desnutrição protéica em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 44:

Wakitani S., Saito T. & Caplan A.I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle and Nerve*. 18:1417–1426.

Weiss L. 1976. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* 186:161–184

Weiss L, Geduldig U. 1991. Barrier cells: stromal regulation of hematopoiesis and blood cell release in normal and stressed murine bone marrow. *Blood* 78: 975–990.

Zago M.A. & Covas D.T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Ed. Atheneu. 2006.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu identificar componentes celulares da medula óssea de cutias e avaliar a fração de células mononucleares cultivadas *in vitro*, contribuindo para a obtenção de informações importantes para futuras pesquisas que visem à utilização da cutia como novo modelo biológico em terapia celular.

Os tipos celulares da medula óssea de cutia apresentaram aspectos morfológicos similares às células de humanos quanto à caracterização dos progenitores hematopoéticos, no entanto, são necessárias avaliações imunofenotípicas por meio de histoquímica para identificação de estágios celulares mais indiferenciados. Estudos preliminares foram realizados, que geraram dissertação defendida junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal, com a morfologia de células do sangue periférico de cutia (Conde Júnior, 2008), o que iniciou os estudos nesta área de conhecimento.

Os protocolos utilizados para o isolamento, expansão, quantificação e congelamento mostraram-se aplicáveis à população de células cultivadas neste experimento. Uma vez que se pode afirmar a presença de células aderentes, cuja morfologia fibroblastóide manteve-se durante oito passagens formando colônias em monocamada, características que sugerem a presença de células-tronco mesenquimais. Contudo, faz-se necessário a continuação de pesquisas que visem o melhoramento dos protocolos utilizados, a avaliação da viabilidade celular pós-criopreservação através do cultivo das células que foram congeladas, além da verificação dos pré-requisitos essenciais para definição de células-tronco mesenquimais: diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro*; e o conhecimento da expressão positiva e negativa de moléculas de superfície, verificada por meio de marcadores moleculares adaptados à espécie *Dasyprocta primnolopha*.

Ressalta-se ainda o fato deste ser um trabalho pioneiro na área de cultivo celular dentro do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-UFPI, o que além de abrir horizontes para uma nova linha de pesquisa dentro do referido programa, traz consigo a possibilidade de agregação de recursos humanos, dentre os quais se destacam alunos de doutorado e pós-doutoramento PRODOC/CAPES, contribuindo para inserir a Universidade Federal no rol das universidades e centros de pesquisa que militam na área de cultivo de células-tronco e sua aplicação em terapia celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, H. M. **Parâmetros morfofisiológicos da reprodução de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766) em cativeiro: análise colpocitológica, morfométrica e concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol, por enzima imunoensaio, durante o ciclo estral.** Teresina, 2009, 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí.
- ALMEIDA, M. M. et al. Estudo morfológico e morfométrico do ovário de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 40:55-62, 2003.
- ASSIS-NETO, A.C. et al. Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v.40, 2003. Suplemento.
- AZEVEDO, L.M. et al. Distribuição intraparenquimal da artéria hepática em cutias (*Dasyprocta sp*, *Rodentia*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v. 45, n. 1, p. 5-10, 2008.
- BARRY, F.P.; MURPHY, R.P.G. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** v. 3, 568-584, 2004.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Marrow stromal stem cells. **The Journal of Clinical Investigation.** USA, v.105, n. 12, p. 1663-1668, 2000.
- BLYDOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 31, p.25-35, 2009. Suplemento.
- BOCELLI-TYNDAL, C. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. **Rheumatology. Oxford.** 46(3): p. 403-408. 2007.
- BONATELLI, M. et al. South America Hystricomorph rodents as reproductive models. **Brazilian College of Animal Reproduction**, Brasil, v. 1, p. 168, 2004.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 21, Suppl. 97, p. 77-89, Jun. 1968.
- CABRAL, R et al **Roedor silvestre como modelo experimental para estudos de lesões renais e aplicabilidade em terapia celular.** In: 4º Simpósio de Células-tronco e terapia celular e gênica da UNIFESP, 2010, São Paulo. 4º Simpósio de Células-tronco e terapia celular e gênica da UNIFESP - 10 e 11 junho de 2010. São Paulo : UNIFESP, 2010. p. 17-17.

CAMARGO, F.D.; CHAMBERS, S.M.; GOODELL, M.A. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. **Cell Proliferation**, v.37, pg. 55–65, 2004.

CAVALCANTE, R. R. C. Digestibilidade aparente de nutrientes de rações balanceadas com alimentos alternativos para cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) em crescimento. **Ciência Animal Brasileira**. v. 6, n. 3, p. 163-171, 2005.

DEUSTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988.

DOHMANN, H.F.R. Pesquisa Básica na Terapia Celular - Luxo ou Necessidade? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 275-277, 2004.

DOMINICI, M. et al. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. USA, v.8, p.315–317, 2006.

EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**. USA, v. 292, p. 154-156, 1981.

FALLA, N. et al. Characterization of a 5-Fluorouracil-Enriched Osteoprogenitor Population of the Murine Bone Marrow. **Blood**. USA, v. 82., n. 12, p. 3580-3591, 1993.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* v. 19, 2004.

FERRAZ, M. S. et al. Collection and evaluation of epididymal spermatozoa in agoutis (*Dasyprocta aguti*) raised in captivity. **Theriogenology**. v. 75, p. 459-462, 2011.

FERRAZ, M.S. **Determinação de protocolo de colheita e análise quanti-qualitativa de espermatozoides epididimários em cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766)**. Teresina, 2010, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí.

FODOR, W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biology and Endocrinology**. USA, v.102, 2003.

FORTES, E.E.A. et al. Aspectos morfológicos da tuba uterina de cutias (*Dasyprocta aguti*, Mammalia: Rodentia). **Brazilian Journal Research animal Science**. v.42, n.2, p.135-142, 2005.

FRIENDESTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**. Moscow, v. 16,n. 3, p. 581-390, 1966.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**. USA, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**. 7;100(1), p.143-155, 2000.

GALLIAN, D.M.C. Por detrás do último ato da ciência- espetáculo: as células-tronco embrionárias. **Estudos Avançados**. São Paulo, v. 55, p. 251-260, 2005.

HALE, S.L. *et al.* Mesenchymal stem cell administration at coronary artery reperfusion in the rat by two delivery routes: a quantitative assessment. **Life Science**, v. 83, n. 13-14, p. 511–515, 2008.

HERZOG, E.L.; CHAI, L., KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**. USA, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

HOSKEN, F. M.; SILVEIRA A. C. **Criação de cutias**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, (Coleção Animais Silvestres, v. 4), 2001.

JAISHWAL, N. *et al.* Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**. USA, v. 64, p.295–312, 1997.

JAVAZON, E.H. *et al.* Rat Marrow Stromal Cells are More Sensitive to Plating Density and Expand More Rapidly from Single-Cell-Derived Colonies than Human Marrow Stromal Cells. **Stem Cells**. USA, v. 19, p. 219-225, 2001.

JIANG, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**. USA, v.418, n. 4, p. 41-49, 2002.

KIM, J-H. *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**. USA, v. 418, p. 50-56, 2002.

KORBLING, M.; STROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. **Bone Marrow Transplantation**. USA, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.

KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Therapy**. USA, v. 9, p. 754–758, 2002.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z.; MARTINEZ-SERRANO, A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders- how to make it work. **Nature Medicine**. USA, v.10, p.42-50, 2004. Suplemento.

LIU, Z.J. *et al.* Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**.v. 06, p. 984–991, 2009

McCULLOCK, E.A.; TILL, J.E. Perspectives on the properties of stem cells. **Nature Medicine**. v. 11, pg.1026-1028, 2005.

MEDVINSKY, A.; DZIERZAK, E. Development of the Hematopoietic Stem Cell: Can We Describe It? **Blood**. USA, v.94, n. 10, p. 3613-3614, 1999.

MEIRELES, L. S.; CHANGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. USA, v. 119, p. 2204-2213, 2006.

MEIRELES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Hematology**. USA, v. 123, p. 702-711, 2003.

MEIRELLES, L.S. et al. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 2287 - 2299, 2008.

MENEZES, D.J.A. et al. Morfologia of the male agouti accessory genital glands (*Dasyprocta prymnolopha*. Wagler, 1837). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, p.793-797, 2010a.

MENEZES, D.J.A. et al. Morfologia dos órgãos genitais externos do macho de cutia (*Dasyprocta aguti*. Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, p.148-153, 2003.

MENEZES, D. J. A. **Caracterização do ciclo reprodutivo anual de cutia macho (Rodentia: Dasyproctidae) criado em cativeiro: dinâmica testicular e avaliação hormonal**. Teresina 2010, 78p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí.

MINGUEL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Chile, v. 33, p. 881-887, 2000.

NAGY, A. et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. **Development**. Canadá, v. 110, p. 815-821, 1990.

NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.Z.C. The hematopoietic stroma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. USA, v. 32, p. 601-609, 1999.

NARDI, N.B. All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. **Medical hypothesis**. USA, v. 64, n. 4, p. 811-817, 2005.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, KAUFMAN, D.S. ; THOMSON, J.A. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. **Stem cells**, v. 19:p. 193-204, 2001.

OLIVEIRA, F.S. et al. Descrição anátomo-radiográfica do esqueleto apendicular da cutia (*Dasyprocta azarae*, LICHTENSTEIN, 1823). **Arquivos de veterinária**. v.25, n.1, 028-031, 2009a.

- OLIVEIRA, F.S. et al. Descrição anátomo-radiográfica do esqueleto axial da cutia (*Dasyprocta azarae*, LICHTENSTEIN, 1823). **Arquivos de veterinária**. v.25, n.1, 024-027, 2009b.
- OLSSON, D.C. et al. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células Mononucleares. **Ciência Rural**. Rio Grande do Sul, v.39, n.1, p. 141-147, 2009.
- ORKIN, S.H.; ZON, L.I. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. **Nature Immunology**. USA, v.3, p. 323-8, 2002. Suplemento.
- ORKIN, S.H. Development of the hematopoietic system. **Current opinion in Genetics & Development**. USA, v. 6, p.597-602, 1996.
- ORKIN, S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineage. **Nature Reviews Genetics**. USA, v. 1, p.57-64, 2000.
- PENNO, A. K. et al. Lobação, ramificação brônquica e distribuição arterial no pulmão da cutia (*Dasyprocta* sp., Mammalia - Rodentia). **Brazilian Journal veterinary Research animal Science**. São Paulo, v. 42, n. 5, p. 331-336, 2005.
- PERLINGEIRO, R.C.; KYBA, M.; DALEY, G.Q. Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. **Development**. USA, v.128, p. 4597-604, 2001.
- PITTENGER, M.E. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**. USA, v. 284, n. 2, p. 143-147, 1999.
- QUESENBERRY, P.J. et al. Stem cell plasticity: an overview. **Blood Cells Molecules & Disease**. Orlando, v. 32, n. 1, p. 1-4, 2004.
- REYES, M. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**. USA, v. 98, n. 9, p. 2615-2625, 2001.
- RIBEIRO, E.E.A. et al. Hemograma e proteinograma de cutias (*Dasyprocta* sp.) hípidas, criadas em cativeiro: influência do sexo e da idade. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. v.60, n.5, p.1123-1127, 2008a.
- RIBEIRO, E.E.A. et al. Níveis iônicos e enzimáticos de cutias (*Dasyprocta* sp.) hípidas, criadas em cativeiro, influência do sexo e da idade. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. v.60, n.3, p.651-655, 2008b.
- ROMANO, G. Stem cell transplantation therapy: controversy over ethical issues and clinical relevance. **Drug News & Perspectives**, Barcelona, v. 17, n. 10, p. 637-645, 2004.
- SANTOS, R.R; SOARES, M.B.P.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Bahia, v.37, p.490-495, 2004. Suplemento.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, J.F.; MELLO, L.E.A.M.; Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**. São Paulo, v.16, p. 13-19, 2005.

SOUSA, F.C.A. **Determinação dos parâmetros ultrassonográficos para avaliação gestacional de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831)**. Teresina, 2010, 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí.

STRAUER, B.E.; KORNOWSKI, R. Stem Cell Therapy in Perspective. **Circulation**. USA, n. 107, p. 929-934. 2003.

SUGIYAMA, D.; TSUJI, K. Definitive Hematopoiesis from Endothelial Cells in the Mouse Embryo, a simple guide. **Trends in Cardiovascular Medicine**. USA, v. 16, n. 2, p.45-49, 2006.

TILL, J. E.; McCULLOCH, E.A. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. **Radiation Research**. USA, v. 14, n. 2, p. 213-222, 1961.

TROPEL, P. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**. 295, p.395-406, 2004.

VILELA, M.J. et al. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 67-72, 2003.

WANG, E.A. et al. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. **Growth Factors**. USA, v.9, p.57-71, 1993.

WANG, L. et al. Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. **Experimental Hematology**. USA, v.33, p. 987-96, 2005. Suplemento.

WIECZOREK, G. et al. Gene expression profile of mouse marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis. **Cell & Tissue Research**. Germany, v. 311, p. 227-237, 2003.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**. 287, p. 1427-1430, 2000.

WOGNUM, A.W.; EAVES, A.C.; THOMAS, T.E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. **Archives of Medical Research**. USA, v.34, n.6, p. 461-475, 2003.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo. Ed. Atheneu. 2006.