

Quantificação de células CD34⁺ do sangue do cordão umbilical de cães

Quantification of CD34⁺ hematopoietic stem cells from the umbilical cord of dogs

Ana Paula Massae Nakage^{1*} Aureo Evangelista Santana¹ Maria Luisa Buffo de Cápua¹
Aline Vieira Godoy¹

RESUMO

As células-tronco promovem a reconstituição hematopoética e de outros tecidos, estando presentes no embrião, no sangue periférico, na medula óssea e no sangue do cordão umbilical (SCU). Os modelos experimentais de células-tronco do sangue periférico e da medula óssea em cães têm propiciado informações relevantes para transplantes de células-tronco em humanos. Entretanto, não existe estudo sobre as células-tronco no SCU canino no Brasil. O objetivo deste ensaio foi quantificar as células nucleadas e as células-tronco CD34⁺ no SCU de cães para propostas de reconstituição hematológica. No presente protocolo experimental, a coleta de SCU de 40 cães neonatos foi realizada para contagem das células nucleadas no contador automático de células sanguíneas e contagem das células-tronco CD34⁺ no citômetro de fluxo. O método de coleta do SCU na porção justaplacentária dos vasos umbilicais permitiu a quantificação das células-tronco CD34⁺. Os valores das células nucleadas do SCU foram reduzidos em relação àqueles do sangue periférico de cães sadios recém-nascidos e adultos. Apesar do volume escasso de SCU (1325µL), a quantidade de células-tronco do cordão umbilical canino ($3,38 \pm 2,72 \text{ CD34}^+ \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$) é semelhante àquela reportada para medula óssea, bem como para o sangue periférico mobilizado de cães adultos, sendo coincidente com aquela preconizada para reconstituição hematopoética.

Palavras-chave: células-tronco, CD34, hematopoética, cordão umbilical, citometria, cães.

ABSTRACT

Stem cells promote the reconstitution of the hematopoietic and other tissues, and are present in the embryo, peripheral blood, bone marrow and umbilical cord blood (UCB). The experimental models of bone marrow and

peripheral blood stem cells in dogs provide important information for stem cells transplants in humans. However, there are no studies on the UCB cells of dogs in Brazil. This experiment aimed at quantifying nucleated and stem cells in the umbilical cord of dogs having as its purpose the hematological recuperation. In this assay, UCB of 40 neonates dogs was collected for nucleated cell count in automatic cell counter and stem cell CD34⁺ count in flow cytometer. The method of UCB collection at the juxta-placental portion of the umbilical vessels allowed UCB blood and stem cell CD34⁺ quantification. The nucleated cell values of UCB were reduced as compared to the reference values of the peripheral blood of healthy neonate and adult dogs. Despite the small volume of UCB (1325µL), the quantity of stem cells in the canine umbilical cord ($3,38 \pm 2,72 \text{ CD34}^+ \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$) is similar to that reported in the bone marrow and mobilized peripheral blood of adult dogs, coinciding with the amount recommend for hematopoietic reconstitution.

Key words: stem cell, CD34, hematopoietic, umbilical cord, cytometry, dogs.

INTRODUÇÃO

Modelos experimentais de estudo da hematopoese em cães têm propiciado informações importantes sobre o transplante de células-tronco hematopoéticas CTH, permitindo a transposição destes achados experimentais para os seres humanos e sendo considerados modelos de experimentação comparada muito promissores (LADIGES et al., 1990 WAGNER & STORB, 1996). O modelo de estudo em cães permite melhor avaliação clínica, assim como maior facilidade

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil. *Endereço para correspondência: Av. José Hebert Faleiros, 600, casa 68, 14098-780, Ribeirão Preto, SP, Brasil. E-mail: apnkg@hotmail.com.

na coleta e na transfusão do sangue (THOMAS, 1999). Além disso, os cães apresentam tamanho relativamente grande, vida longa e doenças genéticas homólogas àquelas dos humanos, quando comparados a camundongos (SUTER et al., 2004). O grupo de pesquisa do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), em Jaboticabal, São Paulo (SP), Brasil, tem desenvolvido ensaios científicos relacionados às células-tronco caninas desde 2000 (NAKAGE & SANTANA, 2006). Há estudos sobre a hematologia do sangue do cordão umbilical (SCU) canino (NAKAGE et al., 2005a; NAKAGE et al., 2005b) e perfil eletroforético das proteínas séricas do SCU de cães (GODOY et al., 2006), mas este é o primeiro relato sobre células-tronco no SCU canino no Brasil. TSUMAGARI et al. (2007) caracterizaram as células CD34⁺ na medula óssea, no sangue periférico e no SCU de cães. Entretanto, o número de parcelas experimentais foi inferior (SCU de sete neonatos) àquele utilizado nesse ensaio (SCU de 40 neonatos).

A clonagem do cDNA para CD34 canino e a obtenção do CD34 canino homólogo (Mc SWEENEY et al., 1996) permitiram a produção de anticorpos monoclonais específicos para CD34 canino (Mc SWEENEY et al., 1998). A marcação com anticorpo monoclonal canino CD34 e sua respectiva contagem por meio da análise no citômetro de fluxo permitem a identificação e a quantificação das CTH da medula óssea de cães (Mc SWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 1999; BRUNO et al., 2001; NIEMEYER et al., 2001; HARTNETT et al., 2002; NAKAGE et al., 2005c). As CTH de cães revelaram-se fenotipicamente e funcionalmente semelhantes às CTH de humanos e camundongos, indicando que o modelo canino é aplicável ao estudo de células-tronco em humanos (Mc SWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 1999; KRAUSE et al., 1994).

Na medula óssea, as células CD34⁺ correspondem a, aproximadamente, 1 a 2% das células mononucleares, porém, são capazes de dar origem aos precursores de todas as linhagens hematopoéticas, evidenciando a habilidade das CTH de reconstituir a hematopoese em primatas, camundongos e cães após mielossupressão (KRAUSE et al., 1996).

A proporção de células CD34⁺ na medula óssea da tíbia de cães jovens foi maior (3,7±0,2%) do que no úmero (2,8±0,2%), na crista ilíaca (1,7±0,3%) e no fêmur (0,26±0,03%), sendo que a porcentagem de CD34⁺ da medula óssea coletada por lavagem foi significativamente maior (9,7±1,0%) do que aquela coletada por aspiração (SUTER et al., 2004) e foi

semelhante à proporção de CD34⁺ da medula óssea fetal humana (HUANG & TERSTAPPEN, 1994; TURNER et al., 1996).

A porcentagem de células CD34⁺ na medula óssea de cães jovens declinou com a idade (SUTER et al., 2004). A medula óssea de cães com duas a três semanas de idade contém entre 10 a 18% de células CD34⁺ e cães com mais de três meses de idade apresentam menos de 5%. A alta proporção de células CD34⁺ no homem também tem sido reportada na medula óssea fetal e de neonatos quando comparada à adulta (ALLEN & HENSHAW, 2001).

O isolamento de células CD34⁺ pode ser realizado por meio da sedimentação por gradiente de densidade, da depleção de linhagens com anticorpos monoclonais, da separação celular com citômetro de fluxo ou da câmara imunomagnética. Um número significativo de células CD34⁺ (2 a 5 x 10⁷ kg⁻¹) foi obtido por meio da separação imunomagnética da medula óssea de cães jovens (SUTER et al., 2004). O desenvolvimento de métodos para purificação e caracterização de CTH caninas permite a utilização do modelo canino para várias propostas experimentais e terapêuticas (NIEMEYER et al., 2001).

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) consiste na injeção intravenosa de progenitores hematopoéticos que se desenvolvem em microambientes especializados, nos quais se diferenciam, proliferam e amadurecem (GASPER & THRALL, 2000). A quantidade de CD34⁺ recomendada para transplantes em cães varia de 1,2 a 3,4 x 10⁶ kg⁻¹ de peso vivo (GENGOZIAN, 2000). O transplante de medula óssea (TMO) alogênico com células CD34⁺, em cães submetidos à terapia mielossupressiva com irradiação, propiciou a reconstituição hematopoética e permitiu antecipar uma função importante nos estudos pré-clínicos, em pacientes da referida espécie, envolvendo a manipulação *in vitro* de células progenitoras hematopoéticas (BRUNO et al., 1999).

O transplante de sangue periférico mobilizado (TSPM) é uma alternativa ao TMO. A administração de fatores de crescimento hematopoéticos permite a mobilização de CTH da medula óssea para o sangue periférico de cães (SANDMAIER et al., 1996). O transplante de CTH do sangue periférico e da medula óssea revelam o potencial terapêutico das células-tronco em cães com linfoma (ABRAMS-OGG et al., 1993), doenças genéticas (HARTNETT et al., 2002; CREEVY et al., 2003), doenças do miocárdio (VULLIET et al., 2004), doenças vasculares (MATSUMURA et al., 2003) e doenças do tecido ósseo (DE KOK et al., 2003).

Portanto, os modelos experimentais de estudo das CTH do sangue periférico e da medula óssea em cães têm propiciado informações pré-clínicas de extrema importância nos transplantes de CTH em humanos, uma vez que a condução de protocolos que utilizam cães permite o emprego do modelo canino para várias propostas experimentais e terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi quantificar as células-tronco CD34⁺ do sangue do cordão umbilical de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Parcelas experimentais

O sangue do cordão umbilical (SCU) foi coletado de 40 neonatos junto ao Instituto de Obstetrícia e Reprodução de Cães e Gatos “Prof. Dr. Vicenti Borelli”, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. As parcelas experimentais nasceram a termo oriundas de cadelas sadias, sendo que 72,5% (n=29) nasceram após parto normal e 27,5% (n=11) por cesariana. As raças das cadelas adultas foram *golden retriever* (27,5%), sem raça definida (17,5%), buldogue (12,5%), pit bull (12,5%), labrador (10%), bóxer (10%), *beagle* (7,5%) e *poodle* (2,5%).

Coleta do sangue do cordão umbilical

Após o nascimento, foram realizados os seguintes procedimentos: a liberação do neonato dos seus respectivos envoltórios placentários, o pinçamento do cordão umbilical na porção justafetal com auxílio de duas pinças hemostáticas e, finalmente, a secção do cordão umbilical e a separação do recém-nascido. Em seguida, a placenta e o cordão umbilical de cada neonato foram posicionados em plano elevado para que o SCU fluísse e fosse coletado por venipunção umbilical na porção justaplacentária do cordão umbilical, com seringa estéril de cinco mL, contendo ácido etilenodiaminotetracético dissódico 10% - EDTA.

Volume de sangue do cordão umbilical, peso do filhote e da placenta

Logo após a coleta, foram determinados o volume de sangue do cordão umbilical de cada filhote e o peso do filhote e da respectiva placenta.

Contagem global de células nucleadas

Imediatamente após a coleta, uma fração de 20µL do sangue do cordão umbilical adicionado de anticoagulante EDTA a 10% foi submetida ao Laboratório de Patologia Clínica da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, para contagem global de

células nucleadas com o auxílio do contador automático de células ACT-8 Coulter, sendo corrigida pela subtração de eritroblastos presentes nos esfregaços do SCU.

Avaliação citofluorométrica

Duzentos microlitros (µL) do SCU foram envasados em eppendorf e mantidos sob refrigeração (4°C) até no máximo 24 horas após a coleta, para análise citofluorométrica junto ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto (SP), localizado no Centro de Terapia Celular (CTC), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade do Estado de São Paulo (USP).

O protocolo *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) foi utilizado na quantificação de células-tronco CD34⁺. A metodologia para a avaliação citofluorométrica consistiu, inicialmente, na identificação de dois tubos estéreis (tubo 1 - CD45⁺PercP/CD34⁺PE e tubo 2 - CD45⁺PercP/IgG1 PE). Nos tubos 1 e 2, foram adicionados 100µL de SCU e cinco µL de anti-CD45⁺ conjugado com biotina (MCA1042B, Serotec), que foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.

Um mL de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado em cada tubo e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por duas vezes, centrifugação a 1800rpm por três minutos, desprezado o sobrenadante e a adição de 2mL de PBS.

Após desprezar o sobrenadante, foram incubados cinco µL de reagente imunológico estreptavidina cy-chrome (554062, Becton Dickinson Pharmingen) em cada tubo por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro e, em seguida, foram adicionados dois mililitros de PBS para a supracitada lavagem do material. No tubo 1 (CD45PercP⁺/CD34⁺PE), foi incubado cinco µL de anticorpo monoclonal canino anti-CD34⁺ conjugados com ficoeritrina-PE (anticorpo 1H6, #559369, Becton Dickinson PharMingen) e no tubo 2 (CD45⁺PercP/IgG1PE), 5µL de IgG1PE por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.

Os tubos 1 e 2 foram lavados com PBS, de acordo com o procedimento citado anteriormente. Em seguida, foram adicionados 200µL de PBS nos dois tubos e as amostras foram submetidas à análise no citofluorômetro *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA) para identificação e quantificação das células-tronco CD34⁺, sob controle de um computador. Os anticorpos

monoclonais CD45⁺ marcam células nucleadas (leucócitos e células CD34⁺ com baixa especificidade) e os CD34⁺ marcam células-tronco (células CD34⁺ com alta especificidade). Entretanto, algumas células exibem tamanho, granulosidade e fluorescência semelhantes às células CD34⁺, sendo consideradas eventos inespecíficos marcados com CD45⁺/IgG1. A contagem de células CD34⁺ é obtida pela subtração de eventos CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos) dos eventos CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos) (Figura 1).

Quantificação de células CD34⁺

A contagem de CD34⁺ mm⁻³ foi estabelecida pela fórmula:

$$CD34^+ \text{ mm}^{-3} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de eventos (CD34}^+/\text{CD45}^+) - \text{n}^\circ \text{ eventos (IgG1}^+/\text{CD45}^+)}{\text{CN}}$$

Nº total de eventos adquiridos

sendo que:

Nº de eventos (CD34⁺/CD45⁺) = células CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos), Nº eventos (IgG1⁺/CD45⁺) = células IgG1⁺/CD45⁺ (eventos inespecíficos), CN = contagem global de células nucleadas e Nº total de eventos = Nº total de células adquiridas.

O valor absoluto de CD34⁺ foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$CD34 \times 10^6 \text{ kg}^{-1} = \frac{CD34^+/\text{mm}^3 \times 10^3 \times \text{volume de SCU (mL)}}{\text{Peso do cão (kg)}}$$

Análise estatística

Os dados obtidos para o peso dos neonatos e das placentas, o volume médio do SCU, a contagem global de células nucleadas e a contagem citofluorométrica de CD34x10⁶ kg⁻¹ foram analisados pela estatística descritiva básica para obtenção dos valores médios e desvios-padrão das variáveis referidas acima (Microsoft Excel 9.0, Microsoft, Redmond, WA, USA).

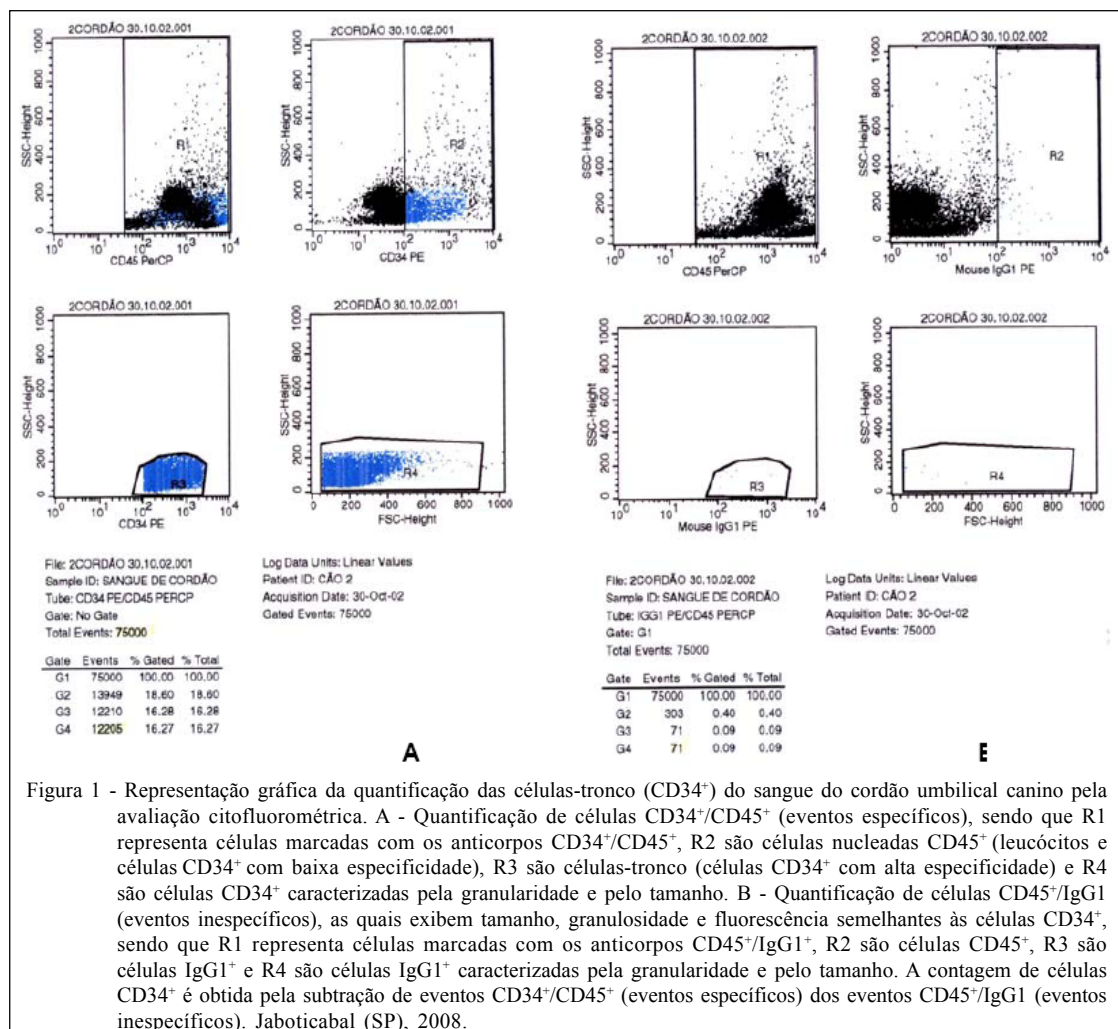


Figura 1 - Representação gráfica da quantificação das células-tronco (CD34⁺) do sangue do cordão umbilical canino pela avaliação citofluorométrica. A - Quantificação de células CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos), sendo que R1 representa células marcadas com os anticorpos CD34⁺/CD45⁺, R2 são células nucleadas CD45⁺ (leucócitos e células CD34⁺ com baixa especificidade), R3 são células-tronco (células CD34⁺ com alta especificidade) e R4 são células CD34⁺ caracterizadas pela granularidade e pelo tamanho. B - Quantificação de células CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos), as quais exibem tamanho, granulosidade e fluorescência semelhantes às células CD34⁺, sendo que R1 representa células marcadas com os anticorpos CD45⁺/IgG1⁺, R2 são células CD45⁺, R3 são células IgG1⁺ e R4 são células IgG1⁺ caracterizadas pela granularidade e pelo tamanho. A contagem de células CD34⁺ é obtida pela subtração de eventos CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos) dos eventos CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos). Jaboticabal (SP), 2008.

RESULTADOS

A coleta do sangue do cordão umbilical (SCU) foi realizada por venipunção da porção justaplacentária do cordão umbilical. Os pesos médios e os desvios-padrão dos 40 cães neonatos e das placentas foram $342,90 \pm 84,17$ g e $70,30 \pm 15,39$ g, respectivamente. O volume médio de SCU coletado foi $1325,00 \pm 848,07$ μ L. O valor médio e o desvio padrão obtidos para contagem global de células nucleadas do SCU foi $8,98 \pm 3,66 \times 10^3$ μ L⁻¹. Com relação à quantificação das células-tronco hematopoéticas, os valores médios e os desvios-padrão de CD34⁺ (%), CD34⁺ mm⁻³ e CD34⁺ obtidos pela avaliação citofluorométrica do SCU de cães neonatos foram $11,09 \pm 7,30$ CD34⁺ (%), $881,74 \pm 572,72$ CD34⁺ mm⁻³ e $3,38 \pm 2,72$ CD34⁺ $\times 10^6$ kg⁻¹, respectivamente.

DISCUSSÃO

Após o nascimento, o cordão umbilical dos cães era pinçado na porção justafetal para separação do filhote. A placenta e o cordão umbilical dos neonatos foram posicionados em plano elevado para que o sangue fluísse, já a coleta do sangue do cordão umbilical (SCU) dos cães foi realizada pela punção dos vasos umbilicais da porção justaplacentária do cordão, sendo que nesta região os vasos sanguíneos são mais calibrosos e retilíneos do que nas porções justafetal e terço médio do cordão umbilical (MIGLINO et al., 2006). A técnica de coleta do SCU foi semelhante àquela utilizada por NAKAGE et al. (2005a, 2005b) e GODOY et al. (2006). A coleta do SCU preconizada em humanos ocorre em bolsas coletoras fechadas e estéreis (SOUSA et al., 1997; ARMITAGE et al., 1999), que acondicionam o volume médio de 71 mL de SCU (BALLEN et al., 2001). Entretanto, neste ensaio o SCU dos cães foi coletado com seringa estéril devido ao pequeno volume médio de sangue obtido (1325 μ L) e ao tamanho reduzido do cordão umbilical.

As vantagens observadas na coleta do SCU com relação à medula óssea são: não apresenta risco ao doador, não há necessidade de hospitalização, não necessita de anestesia geral, não causa desconforto, não necessita da colaboração e disponibilidade de grande número de voluntários, além de que há menor risco de infecções e rejeição (RUBINSTEIN et al., 1993).

As dificuldades encontradas na coleta do SCU relacionaram-se: 1) ao rompimento do cordão umbilical, ao nascimento, devido à alta contratilidade uterina, impedindo a coleta do sangue do cordão umbilical; 2) ao tempo escasso de coleta do SCU, devido à rápida difusão do sangue pelos diversos vasos

sangüíneos do cordão umbilical; 3) ao instinto materno em proteger o filhote, retirar o envoltório placentário do neonato e morder o cordão umbilical deste; 4) à espera do nascimento de cada filhote proveniente de parto normal; e 5) à necessidade de uma pessoa para auxiliar a coleta de SCU de neonatos nascidos por cesariana, devido ao nascimento sucessivo de cães. Apesar dos obstáculos durante a coleta do SCU, em cães, a metodologia aplicada permitiu a quantificação das células eritroleucocitárias e plaquetárias e das células-tronco CD34⁺ do cordão umbilical.

A análise do SCU no contador automático de células foi adequada para realização da contagem global de células nucleadas do SCU de cães, assim como descrito em humanos (CHASIRIPOOMKERE et al., 1999). A contagem de células nucleadas ($8,98 \pm 3,66 \times 10^3$ μ L⁻¹) revelou-se reduzida quando comparada ao valor do sangue periférico de cães com zero a três dias ($16,8 \pm 5,7 \times 10^3$ μ L⁻¹) e semelhante aos adultos (6 a 17×10^3 μ L⁻¹) (MEINKOTH & CLINKENBEARD, 2000).

Estudos estabeleceram a presença de CTH no sangue do cordão umbilical humano (BROXMEYER et al., 1989; GLUCKMAN et al., 1989; BROXMEYER et al., 1992; WAGNER et al., 1992; LIM et al., 1999), que apresentam habilidade de auto-renovação e diferenciação adequadas à reconstituição hematopoética (HERZOG et al., 2003) e são importantes na terapia celular e gênica. Além disso, em recente estudo foi relatada a presença de células-tronco mesenquimais multipotentes no cordão umbilical humano, as quais são capazes de originar diferentes linhagens celulares, demonstrando a capacidade progenitora do cordão umbilical (SECCO et al., 2008). Neste ensaio pioneiro, foram identificadas e quantificadas as células-tronco no SCU de cães. A contagem de células CD34⁺ foi proposta inicialmente como um indicador da capacidade reconstitutiva das células sangüíneas (SIENA et al., 1989) e, atualmente, a citometria de fluxo tem sido amplamente adotada para enumeração de células CD34⁺ (HUSS et al., 2000). O protocolo utilizado para quantificação de CD34⁺ foi o ISHAGE, por ser um método simples, rápido e sensível à citometria de fluxo (SUTHERLAND et al., 1996). A quantificação das células-tronco do SCU foi realizada pela expressão do anticorpo monoclonal canino CD34⁺ e utilizado na medula óssea de cães (Mc SWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 2001; NIEMEYER et al., 2001; HARTNETT et al., 2002).

No SCU, as células-tronco CD34⁺ ($0,88 \times 10^6$ mL) correspondem a 33% das células mononucleares ($2,61 \times 10^6$ mL⁻¹). Na medula óssea, as células CD34⁺ representam apenas 1 a 2% dos mononucleares, porém, são capazes de dar origem aos precursores de todas as

linhagens hematopoéticas, evidenciando a habilidade das CTH de reconstituir a hematopoese em primatas, camundongos e cães após mielossupressão (KRAUSE et al., 1996).

A porcentagem média de células CD34⁺ no SCU de 40 neonatos obtida neste ensaio foi de 11,09%, sendo maior do que aquela relatada (6,1%) por TSUMAGARI et al. (2007), que realizaram a caracterização de células CD34⁺ no SCU de apenas sete *beagles* recém-nascidos. A medula óssea de cães com duas a três semanas de idade contém entre 10 a 18% de células CD34⁺ e cães com mais de três meses de idade apresentam menos de 5% (SUTER et al., 2004). Portanto, a porcentagem de células CD34⁺ de cães declina com a idade. A alta proporção de células CD34⁺ também tem sido reportada na medula óssea fetal e de neonatos quando comparada à adulta (ALLEN & HENSHAW, 2001).

A densidade populacional de células CD34⁺ é proporcional à capacidade de reconstituição hematopoética após o transplante de células-tronco (HUSS et al., 2000). Um importante estudo sobre transplante de medula óssea (TMO) em cães relatou que houve recuperação hematopoética após o TMO autólogo com $1,6 \text{ a } 3,4 \times 10^6$ células CD34⁺ kg⁻¹ e TMO alogênico com $1,75 \text{ a } 6,8 \times 10^6$ células CD34⁺ kg⁻¹. Cães que receberam menos de $1,0 \times 10^6$ CD34⁺ kg⁻¹ apresentaram lenta recuperação da celularidade neutrofílica e plaquetária (BRUNO et al., 1999) e linfocítica (HARTNETT et al., 2002). Cães com distúrbio genético de adesão leucocitária apresentaram recuperação hematológica após o TMO alogênico com $2,53 \times 10^6$ CD34⁺ kg⁻¹ (CREEVY et al., 2003). O transplante de sangue periférico mobilizado (TSPM) com G-CSF e/ou SCF com $4,6 \times 10^6$ células CD34⁺ kg⁻¹ permitiu a reconstituição hematopoética dos cães (SANDMAIER et al., 1996), sendo uma alternativa ao TMO devido à facilidade na coleta e à rapidez de recuperação granulocitária e plaquetária.

A quantidade de células-tronco no SCU de cães ($3,38 \pm 2,72$ células CD34⁺ x 10^6 kg⁻¹) obtida neste ensaio foi semelhante àquela obtida na medula óssea (HARTNETT et al., 2002; CREEVY et al., 2003) e no sangue periférico mobilizado (SANDMAIER et al., 1996; SANDMAIER et al., 2003) de cães adultos, sendo a quantidade recomendada ($1,2 \text{ a } 3,4 \times 10^6$ kg⁻¹) para a reconstituição hematopoética em cães (GENGOZIAN, 2000).

CONCLUSÕES

O método aplicado para coleta de sangue do cordão umbilical de cães permitiu a quantificação

das células nucleadas e das células-tronco CD34⁺ do referido cordão. Os valores das células nucleadas do SCU foram menores que àqueles de cães recém-nascidos e adultos. Apesar do volume escasso de SCU ($1325 \mu\text{L}$), a quantidade de células CD34⁺ no sangue do cordão umbilical canino ($3,38 \pm 2,72$ CD34⁺ x 10^6 kg⁻¹) é semelhante àquela obtida na medula óssea e no sangue periférico mobilizado de cães adultos, sendo a recomendada para transplante de células-tronco em cães. A partir deste estudo pioneiro do SCU de cães no Brasil, novos ensaios poderão ser realizados a fim de avaliar a viabilidade do transplante de progenitores hematopoéticos do cordão umbilical canino para reconstituição hematopoética em diversas patologias comumente observadas na rotina de medicina canina.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste ensaio científico teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 01/01017-7.

COMISSÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética e Biossegurança da FCAV/Unesp, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS-OGG, A. et al. Clinical and pathological findings in dogs following supralethal total body irradiation with and without infusion of autologous long-term marrow culture cells. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.57, n.2, p.79-88, 1993.
- ALLEN, J.E.; HENSHAW, D.L. An in situ study of CD34(+) cells in human fetal bone marrow. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.114, n.1, p.201-210, 2001.
- ARMITAGE, S. et al. Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.23, n.5, p.505-509, 1999.
- BALLEN, K.K et al. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.27, n.1, p.7-14, 2001.
- BROXMEYER, H.E. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, n.10, p.3828-3832, 1989.
- BROXMEYER, H.E. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.89, n.9, p.4109-4113, 1992.

- BRUNO, B. et al. CD34⁺ selected bone marrow grafts are radioprotective and establish mixed chimerism in dogs given high dose total body irradiation. **Transplantation**, Baltimore, v.68, n.3, p.338-344, 1999.
- BRUNO, B. et al. Purified canine CD34⁺Lin⁻ marrow cells transduced with retroviral vectors give rise to long-term multilineage hematopoiesis. **Biology and Blood Marrow Transplantation**, Baltimore, v.7, n.10, p.543-551, 2001.
- CHAISIRIPOOMKERE, W. et al. Study of hematopoietic progenitor cells, hematological values and lymphocyte subsets in cord blood: application for cord blood transplantation. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.30, n.4, p.781-785, 1999.
- CREEVY, K.E. et al. Mixed chimeric hematopoietic stem cell transplant reverses the disease phenotype in canine leukocyte adhesion deficiency. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.95, n.3-4, p.113-121, 2003.
- DE KOK, I.J. et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v.14, n.4, p.481-489, 2003.
- GASPER, P.W.; THRALL, M.A. Hemopoietic stem cell transplantation. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap.17, p.97-101.
- GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hemopoietic progenitors. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap.16. p.91-96.
- GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.321, n.17, p.1174-1178, 1989.
- GODOY, A.V. et al. Perfil eletroforético de proteínas séricas do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.531-535, 2006.
- HARTNETT, B.J. et al. Transplantation of X-linked severe combined immunodeficient dogs with CD34⁺ bone marrow cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v.8, n.4, p.188-197, 2002.
- HERZOG, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, New York, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.
- HUANG, S.; TERSTAPPEN, L.W. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38⁻ hematopoietic stem cells. **Blood**, New York, v.83, n.6, p.1515-1526, 1994.
- HUSS, R. et al. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34⁻(/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem Cells**, Dayton, v.18, n.4, p.252-260, 2000.
- KRAUSE, D.S. et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. **Blood**, New York, v.84, n.3, p.691-701, 1994.
- KRAUSE, D.S. et al. CD34: structure, biology and clinical utility. **Blood**, New York, v.87, n.1, p.1-13, 1996.
- LADIGES, W.C. et al. Canine models of bone marrow transplantation. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v.40, n.1, p.11-15, 1990.
- LIM, L.T.H. et al. The number of nucleated cells reflects the hematopoietic content of umbilical cord blood for transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.24, n.9, p.965-970, 1999.
- MATSUMURA, G. et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*. **Circulation**, Baltimore, v.108, n.14, p.1729-1734, 2003.
- McSWEENEY, P.A. et al. Canine CD34: cloning of the cDNA and evaluation of an antiserum to recombinant protein. **Blood**, New York, v.88, n.6, p.1992-2003, 1996.
- McSWEENEY, P.A. et al. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. **Blood**, New York, v.91, n.6, p.1977-1986, 1998.
- MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K.D. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap.163. p.1057-1063.
- MIGLINO, M.A. et al. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, New York, v.66, n.6-7, p.1699-1702, 2006.
- NAKAGE, A.P.M. et al. Characterization and quantification of blood cells of the umbilical cord of dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v.34, n.4, p.394-396, 2005a.
- NAKAGE, A.P.M. et al. Influência do tipo de parto na hematologia do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.377-380, 2005b.
- NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.966-973, 2005c.
- NAKAGE, A.P.M., SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.325-329, 2006.
- NIEMEYER, G.P. et al. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.29, n.6, p.686-693, 2001.
- RUBINSTEIN, P. et al. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Blood**, New York, v.81, n.7, p.1679-1690, 1993.
- SANDMAIER, B.M. et al. Allogeneic transplants of canine peripheral blood stem cells mobilized by recombinant canine hematopoietic growth factors. **Blood**, New York, v.87, n.8, p.3508-3513, 1996.
- SANDMAIER, B.M. et al. Dog leukocyte antigen-haploidentical stem cell allografts after anti-CD44 therapy and reduced-

- intensity conditioning in a preclinical canine model. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v.31, n.2, p.168-175, 2003.
- SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, Dayton, v.26, n.1, p.146-150, 2008.
- SIENA, S. et al. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, New York, v.74, n.6, p.1905-1914, 1989.
- SOUSA, T. et al. Umbilical cord blood processing: volume reduction and recovery of CD34⁺ cells. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.19, n.4, p.311-313, 1997.
- SUTER, S.E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34⁺ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.101, n.1-2, p.31-47, 2004.
- SUTHERLAND, D.R. et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **Journal of Hematotherapy**, New York, v.5, n.3, p.213-226, 1996.
- THOMAS, E.D. Historical review: a history of haemopoietic cell transplantation. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.105, n.2, p.330-339, 1999.
- TSUMAGARI, S. et al. Characterization of CD34 cells from canine umbilical cord blood, bone marrow leukocytes and peripheral blood by flow cytometric analysis. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.69, n.11, p.1207-1209, 2007.
- TURNER, C.W. et al. Engraftment potential of different sources of human hematopoietic progenitor cells in BNX mice. **Blood**, New York, v.87, n.8, p.3237-3244, 1996.
- VULLIET, P.R. et al. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. **Lancet**, London, v.363, n.9411, p.783-784, 2004.
- WAGNER, J.L.; STORB, R. Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v.3, n.6, p.410-415, 1996.
- WAGNER, J.E. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. **Blood**, New York, v.79, n.7, p.1874-1881, 1992.