

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PADRONIZAÇÃO DA COLETA E QUANTIFICAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS NO SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL DE CÃES.**

Ana Paula Massae Nakage Canesin

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PADRONIZAÇÃO DA COLETA E QUANTIFICAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS NO SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL DE CÃES.**

Ana Paula Massae Nakage Canesin

Orientador: **Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2005

C221p Canesin, Ana Paula Massae Nakage
Padronização da coleta e quantificação das células-tronco
hematopoéticas no sangue do cordão umbilical de cães / Ana Paula
Massae Nakage Canesin. – – Jaboticabal, 2005
vi, 48 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005
Orientador: Áureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Belinda Pinto Simões, Márcia Mery Kogika,
Mirela Tinucci Costa, Gilson Hélio Toniollo.
Bibliografia

1. Células-tronco. 2. Cordão Umbilical. 3. Cães. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072.5:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA MASSAE NAKAGE CANESIN - nascida em Jaboticabal, em 4 de agosto de 1974, de nacionalidade brasileira, recebeu o grau de Médica Veterinária em 1998 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. O título de Mestre em Medicina Veterinária na Área de Patologia Animal foi recebido em 2001 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela bênção do aprendizado.

Ao meu marido Rodrigo, pelo apoio incondicional na realização dos meus ideais e pela compreensão da minha ausência em momentos importantes.

Ao Prof. Aureo, meu orientador desde a iniciação científica, que apoiou o desafio de iniciar a linha de pesquisa com células-tronco que, no início do doutorado, não era tão relevante como hoje.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo importante incentivo financeiro ao projeto, tornando possível a sua realização.

Às amigas Maria Luísa Buffo de Cápua (Malu) e Aline Vieira Godoy, pelo trabalho que desenvolvemos, superando os momentos difíceis (procura “desesperada” por cadelas prenhes e espera do nascimento dos cães) e compartilhando os de alegria (aceite da bolsa de pesquisa, nascimento dos filhotes e obtenção das amostras).

Às amigas do laboratório Fernanda, Flávia, Patrícia Coelho, Alessandra, Meire, Patrícia Mendes, Roberta, Denise e Paula pelas risadas e pela produtividade científica.

Aos residentes da Obstetrícia e aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAVJ/UNESP, Eugênio e Matheus, pela colaboração valiosa durante a coleta e avaliação hematológica das amostras.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, principalmente à Patrícia Bonini Palma e Fabiana Rossetto do Laboratório de Citometria de Fluxo, pela acolhida e colaboração nas análises citofluorométricas.

Aos meus pais, irmãos e demais familiares, pela ajuda essencial na realização deste sonho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e do Hospital Veterinário da FCAVJ/UNESP, pelo apoio indispensável.

Aos proprietários das cadelas que, nem sempre entendiam a importância da coleta do SCU dos filhotes, mas possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que colaboraram na concretização desta etapa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO E PALAVRAS-CHAVE.....	v
“SUMMARY” E “KEY WORDS”.....	vi
I.INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
II.I. Células-tronco.....	1
Hematopoese.....	1
Biologia e Plasticidade das Células-tronco.....	2
Fontes de Células-tronco Hematopoéticas.....	4
II.II. Métodos para Identificação e Quantificação de Células-tronco Hematopoéticas.....	4
Citômetro de Fluxo.....	5
Fundamentos da Técnica Citofluorométrica.....	6
Preparação da Amostra.....	6
Avaliação Citofluorométrica das Células-tronco Hematopoéticas.....	7
II.III.Modelos Experimentais de Estudo de Células-tronco Hematopoéticas em Cães.....	8
II.IV. Anatomia do Cordão Umbilical e Placenta de Cães.....	11
II.V. Sangue do Cordão Umbilical Humano.....	13
Coleta do Sangue do Cordão Umbilical Humano.....	13
Avaliação do Sangue do Cordão Umbilical Humano.....	13
Transplante das Células Sangüíneas do Cordão Umbilical Humano...	14
III. OBJETIVOS	16
IV. MATERIAL E MÉTODOS	16
IV.I. Parcelas Experimentais.....	16
IV.II. Coleta do Sangue do Cordão Umbilical.....	16
IV.III.Volume do Sangue do Cordão Umbilical, Peso do Filhote e da Placenta.....	18
IV.IV. Avaliação Hematológica.....	18
IV.V. Avaliação Citofluorométrica.....	18
IV.VI. Quantificação de Células CD34 ⁺	22
IV.VII. Análise Estatística.....	22
V.RESULTADOS	23
VI. DISCUSSÃO	29
VII. CONCLUSÕES	33
VIII. REFERÊNCIAS	34

LISTA DE ABREVIATURAS

CD – “Cluster Designation”

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CTC – Centro de Terapia Celular

CTH – Células-tronco Hematopoéticas

DECH – Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

FACS – “Fluorescence Activated Cell Sorter”

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSC – “Forward Scatter”

G-CSF – “Granulocyte-Colony Stimulating Factor”

ISHAGE – “International Society of Hematotherapy and Graft Engineering”

MGG –May-Grunwald-Giemsa

MNS - Mononucleares

PE – Ficoeritrina

PercP – “Peridinin chlorophyll Protein”

PMS – Polimorfonucleares

SCU – Sangue do Cordão Umbilical

SCF – “Stem Cell Factor”

SSC – “Side Scatter”

TCTH – Transplante de Células-tronco Hematopoéticas

TMO – Transplante de Medula Óssea

TSPM – Transplante de Sangue Periférico Mobilizado

VCM – Volume Corpuscular Médio

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para o peso do recém-nascido, peso da placenta e volume do sangue do cordão umbilical (SCU) de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.....	24
Tabela 2 - Valores médios do recém-nascido, peso da placenta e volume do SCU de cães neonatos com $\leq$ ou $>$ que 340g. Jaboticabal (SP), 2004.....	24
Tabela 3 - Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para contagem global de Hemácias (He), concentração de Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do SCU de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.....	25
Tabela 4 – Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para a contagem global de células nucleadas e contagem diferencial de polimorfonucleares - PMS (relativa e absoluta) e mononucleares - MNS (relativa e absoluta) no sangue do cordão umbilical de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.....	26
Tabela 5 – Valores individuais, valor médio e desvio-padrão obtidos para contagem global de plaquetas no sangue do cordão umbilical de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.....	27
Tabela 6 – Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para contagem citofluorométrica de CD 34 ⁺ (%), CD 34 ⁺ /mm ³ e CD 34 ⁺ x 10 ⁶ /kg no sangue do cordão umbilical de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.....	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Coleta do sangue do cordão umbilical (SCU) de cães. A - Neonato envolto pela placenta zonária logo após o nascimento. B - Pinçamento na porção justafetal do cordão umbilical. C – Secção do cordão umbilical para separação do neonato e da placenta. D - Coleta do SCU na porção justaplacentária do vaso umbilical. Jaboticabal (SP), 2004.....	17
Figura 2 - Identificação das células-tronco do sangue do cordão umbilical canino pela citometria de fluxo. A - Anticorpos monoclonais CD45⁺ para marcação de células nucleadas e CD34⁺ para células-tronco. B - Citômetro de fluxo “Fluorescence Activated Cell Sorter” (FACS, Becton Dickson, San Jose, CA). C - Avaliação citofluorométrica das células em suspensão de acordo com tamanho, granulosidade e fluorescência – adaptado de Roitt et al. (2003). D – Reação de imunofluorescência nos tubos CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos) e CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos). Jaboticabal (SP), 2004.....	20
Figura 3 – Quantificação das células-tronco (CD34⁺) do sangue do cordão umbilical canino pela avaliação citofluorométrica. A - Quantificação de células CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos) e B – Quantificação de células CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos). Jaboticabal (SP), 2004.....	21

PADRONIZAÇÃO DA COLETA E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE CÃES.

RESUMO - As células-tronco promovem a reconstituição hematopoética e de outros tecidos, estando presentes no embrião, sangue periférico, medula óssea e 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 o SCU canino. O objetivo deste ensaio foi padronizar um método de coleta de SCU de cães saudáveis e quantificar as células sanguíneas e células-tronco CD34⁺ do SCU. No presente protocolo, a coleta de SCU de 40 cães neonatos foi realizada para contagem das células sanguíneas, com o auxílio de um contador automático de células, bem como das células-tronco, CD34⁺, utilizando-se do citômetro de fluxo. O método de coleta do SCU na porção justaplacentária dos vasos umbilicais permitiu a quantificação das células sanguíneas e células-tronco. Os valores hematológicos do SCU, exceto o VCM e o número de plaquetas, apresentaram-se reduzidos com relação àqueles de cães recém-nascidos e adultos. Apesar do volume escasso de SCU (1325 µL), a quantidade de células-tronco do cordão umbilical canino ($3,38 \pm 2,72 \text{ CD34}^+ \times 10^6/\text{kg}$) 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, células sanguíneas, cordão umbilical, citometria, cães

STANDARDIZATION OF COLLECTION AND QUANTIFICATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF THE UMBILICAL CORD OF DOGS.

SUMMARY - Stem cells promote the reconstitution of the hematopoietic and others 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. This experiment aimed at standardizing the collection method and at quantifying blood and stem cells in the umbilical cord of dogs aiming at hematological recuperation. In this assay, UCB of 40 neonates dogs was collected for blood 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 hematological values of UCB, except for the Mean Corpuscular Volume and platelet count, were reduced as compared to the reference values of the peripheral blood of healthy neonate and adult dogs. Despite the small volume of UCB (1325 μ L), the quantity of stem cells in the canine umbilical cord (3.38 ± 2.72 CD34⁺ $\times 10^6$ /kg) is similar to that reported in the bone marrow and mobilized peripheral blood of adult dogs, coinciding with the amount recommend for hematopoietic reconstitution.

Keywords: stem cell, blood cells, umbilical cord, cytometry, dogs

I INTRODUÇÃO

As células-tronco hematopoéticas (CTH) apresentam habilidades de auto-renovação e diferenciação adequadas à reconstituição hematopoética e, estudos recentes, têm revelado a plasticidade das referidas células-tronco em se diferenciar em células não hematopoéticas tais como células hepáticas, neuronais, renais, pancreáticas, pulmonares, gastrintestinais, tegumentares, vasculares, musculares cardíacas e esqueléticas. O potencial proliferativo das CTH tem sido intensamente estudado devido à importância de tais células na terapia celular e gênica.

As CTH estão presentes no parênquima hepático embrionário, sangue periférico, medula óssea e sangue do cordão umbilical (SCU), sendo que, o SCU é considerado uma fonte alternativa de CTH com relação à medula óssea e sangue periférico, com vistas às diferentes modalidades de transplantes.

Os modelos experimentais de transplantes de células-tronco do sangue periférico e da medula óssea, em cães, têm propiciado informações pré-clínicas de extrema importância nos transplantes de CTH em humanos. A condução de protocolos com cães permite a utilização do modelo canino para várias propostas experimentais e terapêuticas.

II REVISÃO DE LITERATURA

II.I CÉLULAS-TRONCO

Hematopoese

A hematopoese ou hemopoiese (*hemato* ou *hemo* significa sangue, *poiesis* significa fazer) é realizada no sistema hematopoético, o qual é constituído por células-tronco hematopoéticas (CTH), células precursoras, células sangüíneas

morfofuncionalmente maduras e tecido de sustentação da hematopoese (microambiente hematopoético), localizado nas cavidades medulares de ossos chatos e longos, baço, fígado, linfonodos e timo. O sistema hematopoético é uma rede integrada de células que inicia o ciclo contínuo de diferenciação de uma pequena população de CTH que dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue e do sistema imune, fundamentando a teoria monofilética da origem do sangue (GASPER, 2000).

As CTH, ou células progenitoras hematopoéticas pluripotenciais, dão origem a progenitores oligopotenciais, os quais produzem progenitores de duas ou mais linhagens celulares e diferenciam-se em células unipotenciais, caracterizadas pela produção de uma única linhagem celular. A célula progenitora unipotencial desenvolve-se em células precursoras, morfologicamente reconhecíveis, que dão origem às células sangüíneas maduras, mediante estímulo adequado (RICHMAN et al., 1978).

A hematopoese e a hemocaterese permanecem em equilíbrio, porém, sob a ação de determinados fatores de crescimento, microambientais ou humorais, pode ocorrer um desequilíbrio, estimulando a reposição hematopoética. Tal resposta ocorre graças à existência de um compartimento de células-tronco primitivas na medula óssea, o qual responde a estas demandas, produzindo células precursoras dos tipos celulares específicos que requerem expansão (METCALF, 1981).

Biologia e Plasticidade das Células-tronco

A maioria das CTH está na fase de repouso (G_0) do ciclo celular e há pouca atividade mitótica no compartimento das células-tronco, no qual ocorre a auto-renovação das referidas células e a manutenção da hematopoese pela proliferação clônica. Morfologicamente, as CTH assemelham-se aos pequenos linfócitos, tendo alta razão núcleo-citoplasma, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico destituído de grânulos (GASPER, 2000).

As células-tronco são classificadas de acordo com o seu tecido de origem, bem como seu potencial em se diferenciar em um ou mais tipos específicos de células maduras. Algumas células-tronco são mais versáteis do que outras. Por exemplo, o

zigoto e suas células-filhas intermediárias são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de célula, incluindo todas as células embrionárias, fetais, adultas e extra-embrionárias, como as da placenta. As células-tronco pós-natais, apesar de serem pluripotentes, apresentam capacidade de diferenciação mais limitada (HERZOG et al., 2003).

A CTH tem origem mesenquimal e, durante o período de vida intra-uterino, está presente no saco vitelino embrionário e, posteriormente, desloca-se por via hematogêna para o fígado, baço, linfonodos e timo fetal. Na metade do período de vida intra-uterino, a hematopoese passa a ocorrer na medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoético no final da gestação até a vida adulta (JAIN, 1986).

As células-tronco mesenquimais ou estromais têm habilidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, e adipócitos, em resposta a determinados estímulos (PITTENGER et al., 1999). Várias citocinas e técnicas de isolamento (imunomagnética e física) têm sido utilizadas para identificar e expandir as células-tronco mesenquimais (SIMMONS et al., 1994; GRONTHOS et al., 2003).

As CTH são as únicas células do sistema hematopoético que exibem potencial proliferativo extensivo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema linfo-hematopoético continuamente até a morte (GASPER, 2000; HERZOG et al., 2003).

Estudos recentes em humanos têm revelado a plasticidade das células-tronco hematopoéticas, que podem se diferenciar em células não hematopoéticas de vários tecidos, incluindo células do fígado (ALISON et al., 2000; AUSTIN & LAGASSE et al., 2003; KORBLING et al., 2002), sistema nervoso central (MEZEY et al., 2000; AKIYAMA et al., 2002; JIN et al., 2002), rins (CORNACCHIA et al., 2001; KALE et al., 2003), pâncreas (HESS et al., 2003; IANUS et al., 2003), pulmões (THEISE et al., 2002), pele (BADIAVAS et al., 2003), trato gastrointestinal (OKAMOTO et al., 2002), coração (ORLIC et al., 2001; QUAINI et al., 2002; STAMM et al., 2003; TSE et al., 2003) e músculo esquelético (FERRARI et al., 1998; GUSSONI et al., 2002).

Entretanto, há relatos contradizendo a capacidade de plasticidade das células-tronco adultas, sendo que novos estudos são necessários para avaliar a possibilidade

de regeneração tecidual e a relevância clínica do transplante de células-tronco (QUESENBERRY et al., 2004; ROMANO, 2004; TANG, 2004).

Fontes de Células-tronco Hematopoéticas

Estudos iniciais em primatas e humanos estabeleceram que as CTH estão presentes no sangue periférico (KESSINGER et al., 1988; SIENA et al., 1989; SCHOTS et al., 1996; ARMITAGE et al., 1997; ABONOUR et al., 1998; PÉREZ-SIMON et al., 1998), parênquima hepático do embrião (FORRESTER et al., 1991; RICE et al., 1994), medula óssea (KESSINGER et al., 1988; WAGNER et al., 1992; HUANG et al., 1998) e sangue do cordão umbilical (BROXMEYER et al., 1989; GLUCKMAN et al., 1989; BROXMEYER et al., 1992; WAGNER et al., 1992; LIM et al., 1999).

Vários relatos em humanos atestam que, as CTH com maior potencial proliferativo para o transplante são as células-tronco embrionárias, seguidas pelas células do cordão umbilical, medula óssea do adulto e sangue periférico (LANSDORP, 1995; REBEL et al., 1996; MAYANI; LANSDORP, 1998; VERFAILLIE, 2002).

Apesar do número de CTH funcionais no SCU humano ser dez vezes menor do que na medula óssea, a capacidade proliferativa das células-tronco do SCU é superior àquelas provenientes da medula óssea e do sangue periférico (BENITO et al., 2004), sendo que, o sucesso do transplante de células-tronco do SCU humano pode ser atingido com um décimo da quantidade necessária para o TMO (HOWS, 2001).

A ocorrência da doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) em transplante de SCU é reduzida quando comparada àquela do transplante de sangue periférico e medula óssea, devido, possivelmente, à imaturidade imunológica das CTH e ausência de células T maduras no SCU (WAGNER, 1993; GLUCKMAN et al., 1998), permitindo melhor tolerância imunológica no transplante de SCU (BENITO et al., 2004).

II.II MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Estudos citomorfológicos e citoquímicos são métodos clássicos para caracterizar e classificar células hematopoéticas (JAIN, 1986), porém técnicas de imunocitoquímica

e imunofenotipagem (anticorpos monoclonais) têm promovido um avanço na definição e classificação de células sangüíneas, particularmente aquelas de baixo grau de diferenciação. Os anticorpos monoclonais conjugados com compostos fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), podem ser incubados com as células a serem analisadas, permitindo a identificação e quantificação citofluorométrica de tais células (GRINDEM, 1996). A citometria de fluxo é um recurso emergente na Medicina Veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001).

Citômetro de Fluxo

O citômetro de fluxo é um separador de células ativado por imunofluorescência (FACS – “Fluorescence Activated Cell Sorter”) que mede a intensidade de fluorescência de cada célula, sendo que as células são separadas de acordo com a sua fluorescência característica (ROITT et al., 2003).

As células da amostra em suspensão são marcadas com reagentes fluorescentes específicos para detecção de moléculas de superfície e são introduzidas numa câmara de fluxo. O fluxo de células que atravessa a câmara é envolvido por uma solução tampão, sendo que 500 a 4000 células ou partículas passam em fila única, por segundo, através de um sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por laser de argônio (azul), que tem uma energia de luz incidente de 488nm. Cada célula é avaliada com relação ao tamanho (feixe de luz frontal) e granulosidade ou complexidade interna (feixe de luz lateral), bem como para intensidade de fluorescência para detecção de diferentes marcadores de superfície (imunofenotipagem). A vibração do fluxo celular provoca o rompimento em gotículas que são carregadas eletricamente e, a partir daí, dirigidas através de placas de deflexão eletromagnéticas para serem coletadas em diferentes populações celulares de acordo com os parâmetros medidos, sob controle de um computador (ROITT et al., 2003).

Fundamentos da Técnica Citofluorométrica

A citometria de fluxo é um teste de imunofluorescência que pode ser usado para identificação de determinadas células em suspensão. Portanto, promove a identificação e a quantificação de células com base no tamanho ("Forward Scatter" – FSC), na granulosidade ("Side Scatter" – SSC) e na intensidade de fluorescência destas células (ROITT et al., 2003).

A intensidade de fluorescência das células permite a imunofenotipagem, que consiste na separação de populações distintas de células com marcadores de superfície, representados por anticorpos monoclonais específicos ligados a compostos químicos fluorescentes ou fluorocromos (GRINDEM, 1996).

Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha devido a sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). O termo CD ("Cluster Designation" = denominação de grupamento) é utilizado para denominar os anticorpos monoclonais, obtidos em diferentes laboratórios, contra antígenos leucocitários humanos (ROITT et al., 2003).

Alguns "Workshops" têm sido organizados com o intuito de classificar os anticorpos monoclonais com um número do CD correspondente à nomenclatura humana para diversos animais domésticos. Em relação aos anticorpos monoclonais que marcam os antígenos leucocitários caninos, estes foram definidos durante o "Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino" (1th CLAW – "First Canine Leukocyte Antigen Workshop"), ocorrido em Cambridge (U.K.) em 1993 (COBBOLD; METCALFE, 1994), sendo que, alguns anticorpos monoclonais específicos para cães estão disponíveis comercialmente (BYRNE et al., 2000).

Preparação da Amostra

A coleta e o processamento da amostra variam de acordo com o tipo celular e o método de ensaio. Vários anticoagulantes como o EDTA, citrato de sódio e heparina têm sido utilizados com sucesso. O volume de amostra necessário para análise é, geralmente, de 100µL de sangue total. Células danificadas ou mortas alteram as propriedades de tamanho e granulosidade e propiciam ligação inespecífica de

anticorpos monoclonais. Portanto, o sangue deve ser refrigerado e processado logo após a coleta da amostra (WEISS, 2002).

A metodologia utilizada no processamento citofluorométrico de amostras de sangue é comum na maioria dos ensaios (QUIRKE & DYSON, 1986). Geralmente, as células são incubadas por 30 a 60 minutos com um fluorocromo ou um anticorpo monoclonal específico. Se o anticorpo monoclonal é marcado com o fluorocromo, a suspensão celular é lavada, ressuspensa em solução tampão, e analisada. Se o anticorpo primário não é marcado, tipicamente, um anticorpo imunoglobulina anti-rato é adicionado. O anticorpo secundário marcado se liga proporcionalmente à quantidade de anticorpo primário. Após a remoção do anticorpo secundário em excesso pela lavagem, a amostra é analisada (WEISS, 2002).

Avaliação citofluorométrica das Células-tronco Hematopoéticas

As CTH derivadas do fígado fetal, do cordão umbilical, da medula óssea ou do sangue periférico, podem ser identificadas com o auxílio de um marcador celular caracterizado como uma glicoproteína CD34 (HUSS et al., 2000).

A expressão da proteína de superfície celular CD34, na população de células hematopoéticas que contém células-tronco foi estudada em humanos (BENSINGER et al., 1996), camundongos (LAROCHELLE et al., 1996; MOREL et al., 1996), primatas não-humanos (BERENSON et al., 1988; ANDREWS et al., 1992) e cães (McSWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 1999; BRUNO et al., 2001; NIEMEYER et al., 2001; HARTNETT et al., 2002).

A contagem de células CD34⁺ a serem transplantadas foi proposta inicialmente por SIENA et al. (1989) como um indicador da capacidade reconstitutiva das células sangüíneas. Após o referido estudo, a citometria de fluxo foi amplamente adotada para enumeração de células CD34⁺ (WUNDER et al., 1992).

O protocolo para quantificação de CD34⁺, proposto pelo Comitê de Enumeração de Células-tronco, em 1995, foi aquele indicado pelo ISHAGE ("International Society of Hematotherapy and Graft Engineering"), por ser um método simples, rápido, sensível à citometria de fluxo e adequado à aplicação clínica (SUTHERLAND et al., 1996).

No método ISHAGE, os anticorpos monoclonais CD45⁺ marcam todas as células nucleadas, tais como células-tronco e leucócitos (GRATAMA et al., 1998). Os anticorpos monoclonais CD34⁺ marcam células-tronco. Entretanto, algumas células exibem tamanho, granulosidade e fluorescência semelhantes às células CD34⁺, sendo considerados eventos inespecíficos marcados com CD45⁺/IgG1 (eventos controle). A contagem de células CD34⁺ é obtida através da subtração de eventos CD34⁺/CD45⁺ dos eventos CD45⁺/IgG1 (VENDITTI et al., 1999).

O cálculo da contagem absoluta de células CD34⁺ é realizado através da multiplicação da porcentagem de células CD34⁺ pelo número total de células nucleadas (contagem global de leucócitos) e o volume do sangue colhido. Este número é dividido pelo peso do paciente, resultando no número total de células CD34⁺ /kg (VENDITTI et al., 1999).

Na metodologia para enumeração de células-tronco, a utilização de fluorocromos excitáveis mais brilhantes, como a ficoeritrina (PE), é recomendada por ser mais sensível na detecção de células CD34⁺ (GRATAMA et al., 1998).

A quantificação de CTH humanas com anticorpos monoclonais CD34⁺ tem sido realizada no sangue periférico (KESSINGER et al., 1988; SCHOTS et al., 1996; ARMITAGE et al., 1997; ABONOUR et al., 1998; PÉREZ-SIMON et al., 1998), medula óssea (CORNETTA et al., 1998; MIELCAREK et al., 2004) e cordão umbilical (GLUCKMAN et al., 1989; LIM et al., 1999; COHEN; NAGLER, 2004).

II.III MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM CÃES.

Modelos experimentais de estudo da hematopoese, em cães, têm propiciado informações importantes sobre o transplante de 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; STORB et al., 1998). O modelo de estudo, em cães, permite melhor

avaliação clínica, assim como, maior facilidade na coleta e transfusão do sangue (THOMAS, 1999). Além disso, os cães apresentam tamanho relativamente grande, vida longa e doenças genéticas homólogas às daquelas dos humanos, quando comparados a camundongos (PATTERSON, 2000; SUTER et al., 2004).

A clonagem do cDNA para CD34 canino e a obtenção do CD34 canino homólogo (McSWEENEY et al., 1996), permitiram a produção de anticorpos monoclonais específicos para CD34 canino (McSWEENEY 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 quantificação das CTH da medula óssea de cães (McSWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 1999; BRUNO et al., 2001; NIEMEYER et al., 2001; HARTNETT et al., 2002).

As CTH de cães revelaram-se fenotipicamente e funcionalmente semelhante às CTH de humanos e camundongos, indicando que o modelo canino é aplicável ao estudo de células-tronco, em humanos (KRAUSE et al., 1994; McSWEENEY et al., 1998; RATAJCZAK et al., 1998; BRUNO et al., 1999).

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 ($3,7 \pm 0,2\%$) do que no úmero ($2,8 \pm 0,2\%$), crista ilíaca ($1,7 \pm 0,3\%$) e fêmur ($0,26 \pm 0,03\%$), sendo que a porcentagem de CD34⁺ da medula óssea colhida por lavagem foi significativamente maior ($9,7 \pm 1,0\%$) do que aquela colhida por aspiração (SUTER et al., 2004) e foi semelhante à proporção de CD34⁺ da medula óssea fetal humana (HUANG & TERSTAPPEN, 1994; THILAGANATHAN et al., 1994; TURNER et al., 1996; GOLFIER et al., 2000).

A porcentagem de células CD34⁺ na medula óssea de cães jovens declinou com a idade. 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). A alta proporção de células CD34⁺ no homem também tem sido reportada na medula óssea fetal e de neonatos quando comparada à adulta (KONG et al., 1997; ALLEN & HENSHAW, 2001).

O isolamento de células CD34⁺ pode ser realizado através da sedimentação por gradiente de densidade, depleção de linhagens com anticorpos monoclonais, separação celular com citômetro de fluxo ou câmara imunomagnética. Um número significativo de células CD34⁺ (2 a 5 x 10⁷/kg) foi obtido através 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. Entretanto, a transferência de novas células imunológicas pode resultar na doença do enxerto contra o hospedeiro (GASPER & THRALL, 2000). A quantidade de CD34⁺ recomendada para transplantes em cães varia de 1,2 a 3,4 x 10⁶/kg de peso vivo (GENGOZIAN, 2000).

Estudos recentes têm revelado que os transplantes autólogos e alogênicos de CTH são aqueles mais aplicáveis à medicina veterinária. O transplante autólogo envolve a remoção temporária de CTH do próprio receptor, seguida pela mielossupressão, induzida quimicamente ou radiologicamente, e reinfusão das CTH, sendo que a técnica é simples. O transplante alogênico consiste na infusão de CTH de um indivíduo da mesma espécie com genoma diferente, sendo que o doador deve ser imunologicamente compatível com o receptor para evitar a DECH (GASPER & THRALL, 2000).

A irradiação corpórea total, antes, e a imunossupressão com ciclosporina, após o TMO alogênico em cães com antígeno leucocitário idêntico e da mesma ninhada, estabeleceram o quimerismo hematopoético e inibiram as reações de DECH, devido à depleção de linfócitos T do enxerto (STORB et al., 1997).

O 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).

Atualmente, o transplante de sangue periférico mobilizado (TSPM) é uma alternativa ao TMO. A administração de fatores de crescimento hematopoéticos, tais como, o fator estimulante de colônia granulocitária ("granulocyte-colony stimulating factor" ou G-CSF) ou o fator de célula-tronco ("stem cell factor" ou SCF) permite a mobilização de CTH da medula óssea para o sangue periférico de cães, sendo que o método de colheita e a recuperação granulocitária e plaquetária no TSPM são mais vantajosos do que no TMO (REVEL et al., 1994; SANDMAIER et al., 1996).

O transplante de CTH do sangue periférico e medula óssea revelam o potencial terapêutico das células-tronco em cães com linfoma (APPELBAUM et al., 1986; ABRAMS-OGG et al., 1993), doenças genéticas (BREIDER et al., 1989; GOERNER et al., 1999; HARTNETT et al., 2002; CREEVY et al., 2003; STELZNER et al., 2003), doenças do miocárdio (KOVACIC et al., 2004; VULLIET et al., 2004), doenças vasculares (BHATTACHARYA et al., 2000; HE et al., 2003; MATSUMURA et al., 2003) e doenças do tecido ósseo (ARINZEH et al., 2003; 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. Sendo que, a condução de protocolos utilizando-se de cães permite o emprego do modelo canino para várias propostas experimentais e terapêuticas.

II.IV ANATOMIA DO CORDÃO UMBILICAL E DA PLACENTA DE CÃES

O cordão umbilical é o anexo fetal que une o feto à placenta e que apresenta no seu interior os vasos umbilicais, que são responsáveis pelas trocas sangüíneas entre os organismos fetal e materno. Nos carnívoros, o cordão umbilical é capaz de suportar o triplo do peso fetal, portanto a mãe morde o cordão após o parto com o intuito de

rompê-lo. O tamanho do cordão umbilical do cão equivale à metade do comprimento corporal do feto (MICHEL & SCHWARZE, 1970). O cordão umbilical dos carnívoros é espesso, curto e tem comprimento médio de 6,5 cm (ZANCO, 1998).

O cordão umbilical de cães é dividido em três porções: justafetal, média e justaplacentária. Na porção justafetal, encontram-se duas artérias umbilicais (cranial e caudal), uma veia umbilical, o pedículo alantoídeo e o pedículo do saco vitelino. Na porção média, ocorrem ramificações das artérias umbilicais cranial e caudal dando origem a quatro ramos (primeiro e segundo ramos craniais e caudais) e, além disso, verificam-se as confluências venosas das raízes venosas cranial e caudal, que são constituídas pelas primeiras radículas craniais e pelas segundas radículas caudais, respectivamente. Na porção justaplacentária, observam-se quatro ramos arteriais e quatro radículas venosas, atingindo a placenta, distribuindo-se pelos lados esquerdo e direito da cinta placentária, próximo aos hematomas marginais (ZANCO, 1998).

Os carnívoros são denominados deciduados por possuírem placentas verdadeiras endoteliocoriais, caracterizadas pela união materno-fetal íntima com o endométrio, havendo desprendimento de tecidos uterinos e endometriais no parto. Além disso, a forma externa da placenta de carnívoros é caracterizada pela distribuição das interdigitações coriônicas materno-fetais lamelares em forma de cinto, constituindo a placenta zonária (NODEN & LAHUNTA, 1990).

O sangue materno é separado do sangue fetal pela barreira placentária, constituída pelo endotélio materno, tecido conectivo, epitélio materno, epitélio coriônico e endotélio fetal (LEISER & KAUFMANN, 1994). Porém, a barreira tissular é mais estreita nas margens da faixa zonária, permitindo o extravasamento de sangue a partir dos vasos sangüíneos maternos para o tecido fetal. A degradação da hemoglobina nestes “hematomas” marginais é responsável pela pigmentação verde-brilhante, denominada hemoclorina, que contrasta com o vermelho intenso da placenta (DYCE et al., 1990).

O fluxo sangüíneo materno-fetal dos carnívoros é classificado como fluxo em corrente secundária simples, devido à disposição perpendicular dos capilares maternos e fetais em relação ao fluxo sangüíneo principal na área de trocas (LEISER &

KAUFMANN, 1994). Não há mistura de sangue arterial e venoso no cordão umbilical e na placenta, devido à ausência de anastomoses entre os vasos sangüíneos (ZANCO, 1998).

II.V SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Coleta do sangue do cordão umbilical humano

O SCU, na espécie humana, é colhido por punção da veia umbilical utilizando-se seringas (HARRIS et al., 1994) ou bolsas coletoras contendo CPDA (citrato-fosfato-dextrose-adenina). A coleta de SCU em bolsas coletoras fechadas e estéreis reduz a contaminação bacteriana e fúngica (SOUSA et al., 1997; ARMITAGE et al., 1999).

Ademais, a coleta do SCU não oferece risco ao doador, não requer hospitalização, não necessita de anestesia geral, não causa desconforto, não necessita da colaboração e disponibilidade de grande número de voluntários, causa risco reduzido de infecções e rejeição; tendo assim, vantagens sobre a coleta de medula óssea (RUBINSTEIN et al., 1993; WAGNER, 1993).

Vários métodos de coleta do SCU humano têm sido propostos, sendo que, fatores relacionados ao parto podem influenciar as características do SCU (AUFDERHAAR et al., 2003), tais como, o tipo de parto (NIKISCHIN et al., 1997; YAMADA et al., 2000; SPARROW et al., 2002; SOLVES et al., 2003) e a dequitação placentária (SURBEK et al., 2000; LASKY et al., 2002; PAFUMI et al., 2002; SPARROW et al., 2002; SOLVES et al., 2003).

Avaliação do sangue do cordão umbilical humano

A presença de células progenitoras hematopoéticas no sangue do cordão umbilical humano foi inicialmente relatada por Knudtzon (1974) e, posteriormente, por Nakahata & Ogawa (1982), Emerson et al. (1985) e Christensen et al. (1986). O potencial hematopoético do SCU tem sido definido pelo número de células CD34⁺, sendo que os valores da contagem absoluta de células CD34⁺ do SCU humano são variados, tais

como, $3,9 \times 10^6$ CD34⁺/kg (VENDITTI et al., 1999) e 2 a 4×10^6 CD34⁺/kg (GILMORE et al., 2000).

A avaliação do SCU, mantido a 4° C (SOUSA et al., 1997; M-REBOREDO et al., 2000) ou a 24° C (ARMITAGE et al., 1999), foi realizada até 24 horas após a sua coleta (ADEMOKUN et al., 1997; SOUSA et al., 1997; M-REBOREDO et al., 2000). Broxmeyer et al. (1989) avaliaram as células nucleadas progenitoras, assim como a esterilidade de, pelo menos, 100 amostras de SCU antes e após a criopreservação. O SCU permaneceu viável a 4°C ou 25°C por, no mínimo, três dias após a coleta.

As contagens globais dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas do SCU podem ser realizadas com o auxílio de um contador automático de células, assim como, a contagem diferencial de leucócitos maduros e de seus precursores por meio de esfregaços corados com May-Grunwald e Giemsa (RUBINSTEIN et al., 1995).

Valores hematológicos (exceto o número de hemácias e a concentração de hemoglobina corpuscular média), sub-populações linfocitárias (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) e células progenitoras hematopoéticas de SCU de neonatos apresentaram-se mais elevados do que aqueles obtidos no sangue periférico de adultos saudáveis, quando avaliados por contadores automáticos de células, citometria de fluxo e culturas celulares semi-sólidas (CHASIRIPOOMKERE et al., 1999).

Transplante de células sangüíneas do cordão umbilical humano

O conceito inicial de transplante de células do cordão umbilical fundamentou-se em achados experimentais segundo os quais, camundongos irradiados podiam recuperar-se após a administração de sangue fetal (BROXMEYER et al., 1989). A partir destes achados experimentais, estes autores sugeriram o transplante de células progenitoras hematopoéticas presentes no SCU humano. Desse modo, GLUCKMAN et al. (1989) reportaram o primeiro experimento com transplante de SCU em paciente com anemia de Fanconi e concluíram que o SCU pode ser considerado uma importante fonte de células progenitoras para reconstituição hematopoética. O transplante de células do SCU tem como finalidade o restabelecimento da atividade hematopoética diante de diversos estados patológicos, incluindo desordens genéticas, deficiências

imunológicas, neoplasias, assim como para corrigir os estados citopênicos causados por tratamento quimioterápico prolongado (WAGNER, 1993).

A quantidade de células nucleadas infundida no receptor é um fator significativo na velocidade de recuperação de neutrófilos e plaquetas, após o transplante, e está relacionada à frequência de CD34⁺ e ao conteúdo de células progenitoras hematopoéticas (LIM et al., 1999).

O transplante de células do SCU é mais comumente realizado em crianças, já que, só é possível a coleta de uma unidade de sangue do cordão umbilical, porém há técnicas de enriquecimento do SCU, cuja adição de fatores de crescimento é capaz de promover expansão celular, possibilitando o transplante em adultos (KURTZBERG et al., 1996; GILMORE et al., 2000; BENITO et al., 2004).

O elevado potencial proliferativo do SCU, como nova fonte de CTH, estimulou o desenvolvimento de vários centros de pesquisa de SCU, tais como o Eurocord, assim como diversos bancos de SCU espalhados por diversos países (RUBINSTEIN et al., 1995; GLUCKMAN et al., 1998).

No Brasil, em 1998, a Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea tomou a iniciativa de criar um grupo capaz de estruturar uma rede nacional pública de bancos de SCU. Em agosto de 2000, uma portaria do Ministério da Saúde regulamentou os primeiros padrões e procedimentos dessa rede, denominada Brasilcord, o qual é constituído pelos seguintes centros de pesquisa: INCA – CEMO (RJ), Hemocentro de Ribeirão Preto (SP), UNICAMP - Campinas (SP), UFPR - Curitiba (PR), Hospital Albert Einstein - São Paulo (SP) e Hospital das Clínicas - Hemocentro (SP). Em 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu norma definitiva regulamentando o funcionamento e restringindo a comercialização do SCU (BRASIL, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que, cerca de 70000 unidades de SCU estão registradas e disponíveis para o transplante em mais de 50 bancos de SCU do mundo, sendo que mais de 2000 pacientes (1500 crianças) já receberam transplante de SCU (BENITO et al., 2004). Entretanto, apesar da importância do sangue do cordão

umbilical, como fonte de células-tronco, e do modelo experimental em cães, não existe estudo sobre as células do sangue do cordão umbilical canino.

III OBJETIVOS

Os objetivos deste ensaio foram padronizar um método de coleta de sangue do cordão umbilical de cães saudáveis e quantificar as células sanguíneas e células-tronco CD34⁺ do cordão umbilical.

IV MATERIAL E MÉTODOS

IV.I PARCELAS EXPERIMENTAIS

O sangue do cordão umbilical (SCU) foi colhido de 40 neonatos, a termo, oriundos de cadelas saudáveis após parto normal (n=29) ou cesariana (n=11) 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, Câmpus de Jaboticabal.

IV.II COLETA DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

Após o nascimento, procedeu-se 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, secção do cordão umbilical e separação do recém-nascido e placenta. Ato contínuo, a placenta de cada neonato foi posicionada em plano elevado para que o SCU fluísse e fosse colhido por venipunção umbilical na porção justaplacentária do cordão umbilical, com seringa estéril de cinco mL, contendo ácido etilenodiaminotetracético dissódico 10% - EDTA (Figura 1).

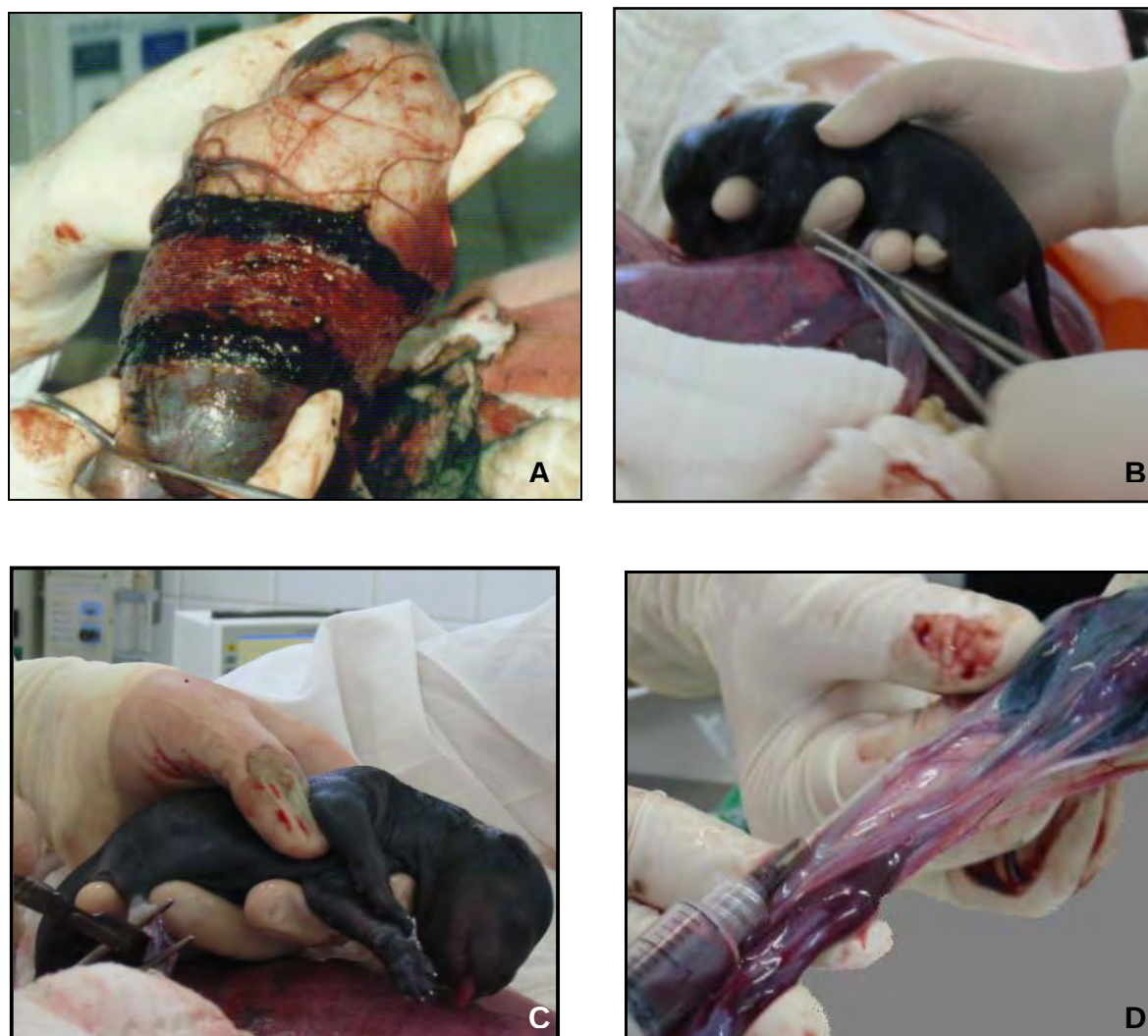


Figura 1 – Coleta do sangue do cordão umbilical (SCU) de cães. A - Neonato envolto pela placenta zonária logo após o nascimento. B - Pinçamento na porção justafetal do cordão umbilical. C – Secção do cordão umbilical para separação do neonato e da placenta. D - Coleta do SCU na porção justaplacentária do vaso umbilical. Jaboticabal (SP), 2004.

IV.III 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, assim como, o peso do filhote e da respectiva placenta.

IV.IV AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Imediatamente após a coleta, uma fração do sangue do cordão umbilical foi submetida ao Laboratório de Patologia Clínica da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para contagens globais de hemácias, células nucleadas e plaquetas, assim como determinação do volume globular, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), todos com o auxílio de um contador automático de células ACT-8 Coulter e contagem diferencial das células nucleadas mononucleares (MNs) e polimorfonucleares (PMNs) em esfregaços sangüíneos corados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa (MMG). A contagem global de células nucleadas foi corrigida pela subtração de eritroblastos presentes nos esfregaços do SCU.

IV.V 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 ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) foi utilizado na quantificação de células-tronco CD34^{+} . 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 $\text{CD45}^{+}/\text{IgG1}$. A contagem de células CD34^{+} é obtida pela subtração de

eventos CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos) dos eventos CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos).

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 100 µL 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 dez 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 1800 rpm por três minutos, desprezado o sobrenadante e adição de dois mL 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), cinco µL 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 200 µL 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 (Figuras 2 e 3).

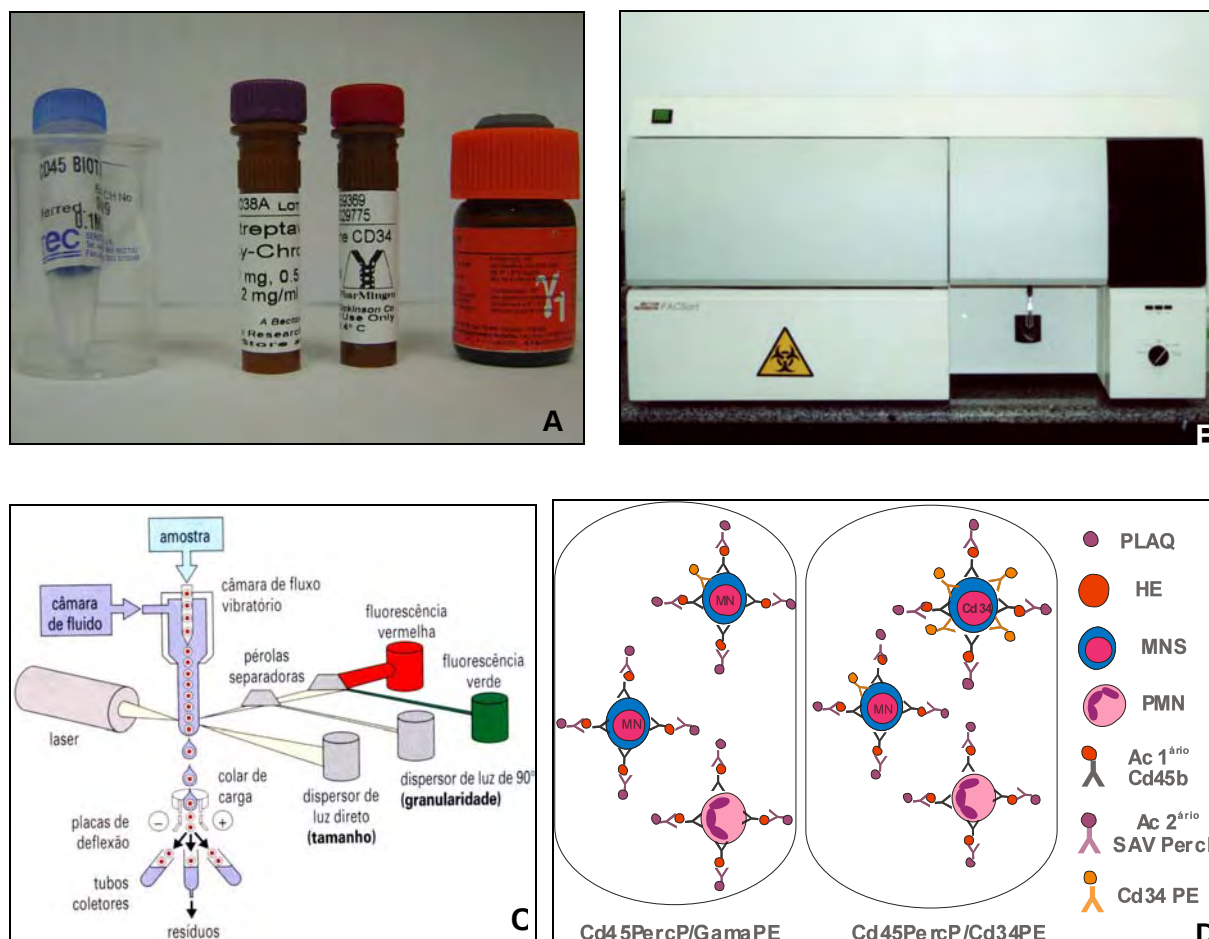


Figura 2 – Método de quantificação das células-tronco do sangue do cordão umbilical canino pela citometria de fluxo. A - Anticorpos monoclonais CD45⁺ para marcação de células nucleadas e CD34⁺ para células-tronco. B - Citômetro de fluxo “Fluorescence Activated Cell Sorter” (FACS, Becton Dickson, San Jose, CA). C - Avaliação citofluorométrica das células em suspensão de acordo com tamanho, granulosidade e fluorescência – adaptado de Roitt et al. (2003). D – Reação de imunofluorescência nos tubos CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos) e CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos). Jaboticabal (SP), 2004.

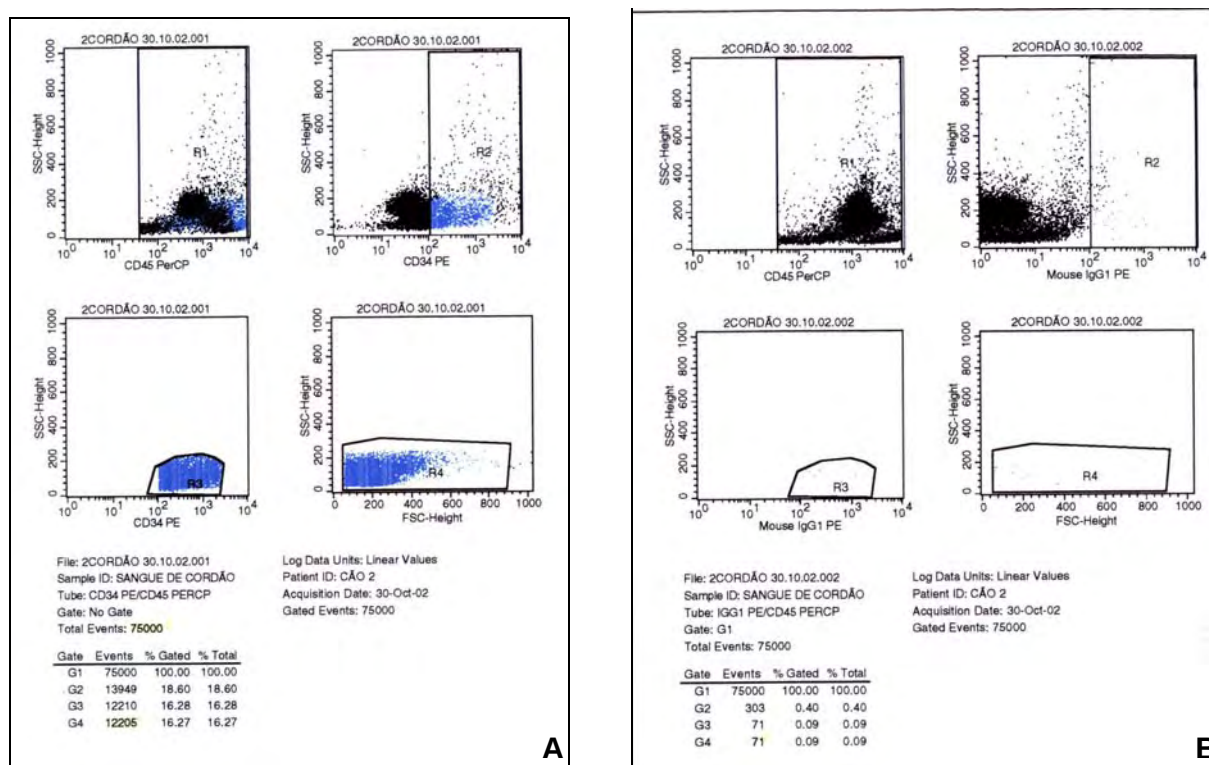


Figura 3 – Representação gráfica da quantificação das células-tronco (CD34⁺) do sangue do cordão umbilical canino pela avaliação citofluorométrica. A - Quantificação de células CD34⁺/CD45⁺ (eventos específicos) e B - Quantificação de células CD45⁺/IgG1 (eventos inespecíficos). Jaboticabal (SP), 2004.

IV.VI QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD34⁺

A contagem de CD34⁺/mm³ foi estabelecida pela fórmula:

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

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.

Nº total de eventos= Nº total de células adquiridas;

e o valor absoluto de CD34⁺ foi calculado através da seguinte fórmula:

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

Sendo que:

Volume de SCU (mL)=volume de SCU colhido.

Peso do cão (kg)=peso do cão doador de SCU.

IV.VII ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para as contagens globais de hemácias, células nucleadas e plaquetas; determinação do volume globular, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); contagem diferencial de células nucleadas (MNs e PMNs); além da contagem citofluorométrica de CD34x10⁶/kg; foram analisados pela estatística descritiva básica para obtenção dos valores médios e desvios-padrão das variáveis referidas acima (SNEDECOR & COCHRAN, 1987).

V RESULTADOS

A coleta do sangue do cordão umbilical (SCU) foi realizada por venipunção da porção justaplacentária do cordão umbilical após o pinçamento da região justafetal do cordão umbilical do recém-nascido.

Os pesos médios e desvios-padrão dos 40 cães neonatos e das placentas, apresentados na Tabela 1, foram $342,90 \pm 84,17$ g e $70,30 \pm 15,39$ g, respectivamente. O volume médio de SCU colhido foi $1325,00 \pm 848,07$ μL. Ao separarmos as parcelas experimentais pelo peso do recém-nascido $\leq$ ou $>$ 340g, os valores médios foram 335,72g e 375,53g para peso do recém-nascido; 68,94g e 70,73g para peso da placenta; 733,33mL e 2200,00 mL para volume de SCU, respectivamente (Tabela 2).

Quanto ao eritrograma do SCU dos neonatos, os valores médios e desvios-padrão obtidos para contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM, expressos na Tabela 3, foram $4,16 \pm 0,87 \times 10^6/\mu\text{L}$; $12,94 \pm 3,05$ g/dL; $41,41 \pm 9,88$ %; $99,17 \pm 7,08$ fL e $31,27 \pm 1,61$ g/dL.

Os valores médios e desvios-padrão obtidos para contagens global de células nucleadas e diferencial de polimorfonucleares (relativa e absoluta) e mononucleares (relativa e absoluta) foram $8,98 \pm 3,66 \times 10^3/\mu\text{L}$; $70,45 \pm 8,42$ %; $6,37 \pm 2,90 \times 10^3/\mu\text{L}$; $29,55 \pm 8,42$ %; $2,61 \pm 1,21 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente (Tabela 4).

Com relação ao trombograma, o valor médio obtido para contagem de plaquetas e o desvio-padrão foram $361,93 \pm 142,56 \times 10^3/\mu\text{L}$, como observado na Tabela 5.

Os valores médios e desvios-padrão de $\text{CD}34^+$ (%), $\text{CD}34^+/\text{mm}^3$ e $\text{CD}34^+ \times 10^6/\text{kg}$ obtidos pela avaliação citofluorométrica do SCU de cães neonatos foram $11,09 \pm 7,30$ $\text{CD}34^+$ (%), $881,74 \pm 572,72$ $\text{CD}34^+/\text{mm}^3$ e $3,38 \pm 2,72$ $\text{CD}34^+ \times 10^6/\text{kg}$, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 1 – Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para o peso do recém-nascido, da placenta e volume do SCU de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.

Recém-nascido	Peso Recém-nascido (g)	Peso Placenta (g)	Volume SCU (μL)
1	250	80	900
2	240	70	600
3	250	70	300
4	250	80	800
5	250	80	400
6	400	80	2000
7	380	80	1000
8	340	60	600
9	400	66	500
10	260	50	600
11	260	50	600
12	350	60	800
13	375	50	1000
14	250	60	400
15	300	60	1400
16	320	50	1000
17	350	70	1200
18	400	50	2600
19	350	50	2300
20	350	40	1500
21	180	75	2000
22	230	75	1000
23	250	75	1500
24	450	100	400
25	350	75	1800
26	250	50	1800
27	442	93	2250
28	400	86	4000
29	382	79	2250
30	450	96	700
31	428	72	1600
32	523	76	2700
33	403	62	1700
34	275	75	500
35	300	50	800
36	300	75	1000
37	467	105	3000
38	373	80	1000
39	458	73	2000
40	480	84	500
VALORES MÉDIOS	342,90	70,30	1325,00
DESVIO PADRÃO	84,17	15,9	848,07

Tabela 2 – Valores médios do peso do recém-nascido, peso da placenta e volume do SCU de cães neonatos com peso $\leq$ ou $>$ que 340g. Jaboticabal (SP), 2004.

	Peso Recém-nascido (g)	Peso Placenta (g)	Volume SCU (μL)
Peso recém-nascido $\leq$ 340g	335,72	68,94	733,33
Peso recém-nascido $>$ 340g	375,53	70,73	2200,00

Tabela 3 – Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para contagem global de Hemácias (He), concentração de Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) do SCU de cães. Jaboticabal (SP), 2004.

Recém-nascido	He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)
1	4,39	13,6	46,0	104,8	29,6
2	3,23	9,8	32,8	101,6	29,8
3	2,22	6,6	21,7	97,5	30,5
4	2,89	9,1	30,3	104,7	30,1
5	2,19	7,3	23,1	105,7	31,5
6	4,88	16,8	50,2	102,8	33,4
7	4,99	17,2	54,3	108,8	31,7
8	4,71	15,7	48,8	103,5	32,3
9	4,38	13,7	42,6	97,3	32,2
10	3,86	12,5	37,9	98,0	33,0
11	4,52	14,1	43,0	95,0	31,2
12	3,84	10,7	36,3	94,3	29,6
13	5,29	15,5	51,6	97,5	30,0
14	2,84	8,4	27,4	96,4	30,8
15	3,96	13,1	40,4	102,2	32,3
16	4,23	14,0	44,4	105,0	31,6
17	4,50	15,5	48,7	108,4	31,8
18	4,23	15,4	48,3	114,2	32,0
19	4,70	14,7	46,7	99,3	31,4
20	4,52	16,0	49,8	110,3	32,2
21	6,05	18,0	58,6	96,7	30,7
22	5,03	14,7	48,2	96,0	30,4
23	3,72	11,1	36,2	97,4	30,6
24	4,14	13,7	44,2	106,8	30,9
25	5,35	17,8	56,0	104,6	31,7
26	5,20	17,3	54,9	105,6	31,5
27	4,13	11,2	36,3	87,8	31,0
28	3,77	10,3	33,6	89,1	30,5
29	3,65	10,4	33,5	91,9	31,2
30	3,36	9,3	29,5	88,0	31,3
31	3,42	10,0	31,9	93,1	31,3
32	4,47	13,0	41,2	92,0	31,6
33	2,90	8,3	25,8	89,1	32,0
34	5,20	15,0	53,6	103,0	28,0
35	4,60	14,3	50,6	109,9	28,3
36	5,30	15,4	53,7	100,5	28,7
37	4,60	14,0	42,0	91,7	34,3
38	3,23	9,1	28,2	87,3	32,3
39	4,05	12,2	40,4	99,9	30,1
40	3,80	12,6	33,8	88,9	37,3
VALORES MÉDIOS	4,16	12,94	41,41	99,17	31,27
DESVIO PADRÃO	0,87	3,05	9,88	7,08	1,61

Tabela 4 – Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para a contagem global de células nucleadas e diferencial de polimorfonucleares - PMS (relativa e absoluta) e mononucleares - MNS (relativa e absoluta) no SCU de cães. Jaboticabal (SP), 2004.

Recém-nascido	Células nucleadas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PMS rel (%)	PMS absol ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	MNS rel (%)	MNS abs ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
1	7,72	87	6,72	13	1,00
2	5,74	69	3,96	31	1,78
3	4,25	71	3,02	29	1,23
4	4,21	71	2,99	29	1,22
5	7,12	68	4,84	32	2,28
6	12,20	91	11,10	9	1,10
7	11,00	82	9,02	18	1,98
8	10,30	79	8,14	21	2,16
9	11,33	64	7,25	36	4,08
10	21,99	77	16,93	23	5,06
11	10,00	78	7,80	22	2,20
12	9,00	70	6,30	30	2,70
13	9,30	71	6,60	29	2,70
14	3,70	73	2,70	27	1,00
15	4,30	67	2,88	33	1,42
16	4,90	62	3,04	38	1,86
17	5,90	75	4,43	25	1,48
18	6,20	69	4,28	31	1,92
19	7,30	78	5,69	22	1,61
20	6,40	64	4,10	36	2,30
21	13,50	73	9,86	27	3,65
22	10,90	75	8,18	25	2,73
23	5,70	74	4,22	26	1,48
24	17,80	74	13,17	26	4,63
25	10,74	55	5,91	45	4,83
26	14,02	62	8,69	38	5,33
27	10,3	61	6,28	39	4,02
28	12,4	74	9,18	26	3,22
29	8,5	74	6,29	26	2,21
30	9,7	54	5,24	46	4,46
31	8,5	52	4,42	48	4,08
32	10,2	78	7,96	22	2,24
33	7,3	62	4,53	38	2,77
34	8,34	81	6,76	19	1,58
35	6,98	72	5,03	28	1,95
36	7,92	72	5,70	28	2,22
37	10,7	63	6,74	37	3,96
38	7,1	70	4,97	30	2,13
39	9,3	62	5,77	38	3,53
40	6,6	64	4,22	36	2,38
VALORES MÉDIOS	8,98	70,45	6,37	29,55	2,61
DESVIO PADRÃO	3,66	8,42	2,90	8,42	1,21

Tabela 5 – Valores individuais, valor médio e desvio-padrão obtidos para contagem global de plaquetas no sangue do cordão umbilical de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.

Recém-nascido	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
1	380
2	357
3	261
4	268
5	314
6	519
7	363
8	168
9	673
10	239
11	417
12	546
13	607
14	358
15	306
16	369
17	418
18	601
19	724
20	557
21	470
22	377
23	309
24	362
25	475
26	387
27	260
28	399
29	160
30	100
31	290
32	303
33	312
34	280
35	242
36	212
37	190
38	312
39	402
40	190
VALOR MÉDIO	361,93
DESVIO PADRÃO	142,56

Tabela 6 – Valores individuais, valores médios e desvios-padrão obtidos para contagem citofluorométrica de CD 34⁺(%), CD 34⁺/mm³ e CD 34⁺ x 10⁶/kg no sangue do cordão umbilical de cães neonatos. Jaboticabal (SP), 2004.

Recém-nascido	CD 34 ⁺ (%)	CD 34 ⁺ /mm ³	CD 34 ⁺ x 10 ⁶ /kg
1	11,77	923,38	3,32
2	17,09	984,40	3,69
3	8,44	533,94	0,65
4	11,53	571,86	1,83
5	7,58	600,83	0,96
6	16,18	2054,09	10,30
7	11,25	1432,56	3,77
8	9,79	1109,09	1,96
9	15,97	1887,68	10,50
10	9,38	2159,01	2,70
11	22,55	2304,93	5,30
12	14,33	1319,40	3,02
13	10,77	1098,34	2,93
14	30,72	1150,75	1,84
15	22,25	964,58	4,50
16	23,31	1142,61	3,57
17	19,93	1180,00	4,04
18	16,85	1061,31	6,90
19	16,62	1263,18	8,30
20	19,76	1304,04	5,59
21	0,24	35,19	0,39
22	0,81	94,54	0,41
23	17,88	1042,07	6,25
24	4,80	956,00	0,85
25	1,74	204,70	1,05
26	3,92	573,50	4,13
27	9,85	1014,34	5,16
28	3,45	428,38	4,28
29	11,81	1003,91	5,91
30	5,74	557,04	0,87
31	10,48	890,8	3,33
32	1,63	168,37	0,87
33	3,87	282,66	1,19
34	5,94	186,60	0,50
35	2,49	505,25	0,92
36	1,34	109,30	0,36
37	11,03	124,01	7,96
38	4,32	324,85	0,87
39	9,84	772,12	3,37
40	16,54	949,96	1,00
VALORES MÉDIOS	11,09	881,74	3,38
DESVIO PADRÃO	7,30	572,72	2,72

VI DISCUSSÃO

A coleta do sangue do cordão umbilical (SCU) de cães foi realizada pela punção dos vasos umbilicais da porção justaplacentária do cordão, sendo que nesta região os vasos sangüíneos são mais calibrosos e retilíneos do que nas porções justafetal e terço médio do cordão umbilical (ZANCO, 1998). O SCU dos cães deste ensaio foi colhido com seringa estéril, devido ao pequeno volume médio obtido (1325 μ L). A técnica de 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 71mL de SCU (BALLEN et al., 2001).

Devido à disparidade nos valores individuais do volume de sangue do cordão umbilical dos cães, foi realizada a comparação entre recém-nascidos com peso $\leq$ e $>$ 340g, sendo que, o volume de SCU de cães neonatos pesando $\leq$ 340g representou um terço daquele colhido em recém-nascidos com peso $>$ 340g. Portanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar os fatores relacionados ao volume de SCU de cães.

As vantagens da coleta do SCU com relação à medula óssea estão relacionadas à ausência de risco ao doador, não requer hospitalização, não necessita de anestesia geral, não causa desconforto, não necessita da colaboração e disponibilidade de grande número de voluntários, além de menor risco de infecções e rejeição (RUBINSTEIN et al., 1993; WAGNER, 1993).

As dificuldades encontradas na coleta do SCU relacionaram-se ao rompimento do cordão umbilical, ao nascimento, devido à alta contratilidade uterina, impedindo a coleta do sangue do cordão umbilical; o tempo escasso de coleta do SCU, devido à rápida difusão do sangue pelos diversos vasos sangüíneos do cordão umbilical; o instinto materno em proteger o filhote, retirar o envoltório placentário do neonato e morder o cordão umbilical deste; a espera do nascimento de cada filhote proveniente de parto normal e a 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 células-tronco CD34⁺ do cordão umbilical.

A análise do SCU no contador automático de células foi adequado para realização do hemograma do SCU de cães, assim como descrito em humanos (CHASIRIPOOMKERE et al., 1999). A contagem global de hemácias ($4,16 \pm 0,87 \times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina ($12,94 \pm 3,05 \text{ g/dL}$), hematócrito ($41,41 \pm 9,88\%$) e CHCM ($31,27 \pm 1,61 \text{ g/dL}$) do SCU foram inferiores àsquelas do sangue periférico de cães de zero a três dias ($4,8 \pm 0,8 \times 10^6/\mu\text{L}$; $15,8 \pm 2,9 \text{ g/dL}$, $46,3 \pm 8,5\%$ e $34,6 \pm 1,4 \text{ g/dL}$) e cães adultos ($5,5$ a $8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$; 12 a 18 g/dL e 32 a 36 g/dL). O VCM do SCU ($99,17 \pm 7,08 \text{ fL}$) foi mais elevado do que aquele de cães recém-nascidos ($94,2 \pm 5,9 \text{ fL}$) e adultos (60 a 77 fL), relatados por Meinkoth & Clinkenbeard (2000).

O eritrograma indica que o SCU de cães neonatos apresenta quantidade reduzida de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito, além da presença de hemácias jovens macrocíticas (VCM elevado) hipocrômicas (CHCM reduzido), indicando atividade eritropoiética elevada, necessária à manutenção da volemia devido à expansão do volume plasmático durante os dois primeiros meses de vida dos cães (MEINKOTH & CLINKENBEARD, 2000).

O leucograma do SCU foi constituído por contagem de células nucleadas, polimorfonucleares (PMS) e mononucleares (MNS), pois as células-tronco hematopoéticas (CTH), morfologicamente, assemelham-se às células mononucleares, principalmente, aos pequenos linfócitos, tendo alta razão núcleo-citoplasma, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico destituído de grânulos (GASPER, 2000). As contagens de células nucleadas ($8,98 \pm 3,66 \times 10^3/\mu\text{L}$), PMS ($6,37 \pm 2,90 \times 10^3/\mu\text{L}$) e MNS ($2,61 \pm 1,21 \times 10^3/\mu\text{L}$), do SCU, revelaram-se reduzidas quando comparadas aos valores do sangue periférico de cães com zero a três dias ($16,8 \pm 5,7 \times 10^3/\mu\text{L}$; $11,6 \pm 8,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $5,1 \pm 3,6 \times 10^3/\mu\text{L}$) e semelhantes aos adultos (6 a $17 \times 10^3/\mu\text{L}$; $3,1$ a $13,05 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $1,15$ a $6,15 \times 10^3/\mu\text{L}$), citados por Meinkoth & Clinkenbeard (2000).

As contagens de plaquetas obtidas para o SCU de cães ($361,93 \pm 142,56 \times 10^3/\mu\text{L}$) foram semelhantes àsquelas consideradas como fisiológicas no sangue periférico de

cães de zero a três dias ($302 \times 10^3/\mu\text{L}$) e de adultos (200 a $500 \times 10^3/\mu\text{L}$), reportadas por MEINKOTH & CLINKENBEARD (2000). Os valores hematológicos do SCU, exceto o VCM e o número de plaquetas, apresentaram-se reduzidos com relação àqueles de cães recém-nascidos e adultos.

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. Neste ensaio pioneiro, foram identificadas e quantificadas as células-tronco no SCU de cães. A contagem de células CD34^+ como um indicador da capacidade reconstitutiva das células sangüíneas foi proposta inicialmente por 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 identificação e quantificação das células-tronco do SCU foram realizadas pela expressão do anticorpo monoclonal canino CD34^+ , produzido por McSWEENEY et al. (1998) e utilizado na medula óssea de cães (McSWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 2001; NIEMEYER et al., 2001; HARTNETT et al., 2002).

No SCU, as células-tronco CD34^+ ($0,88 \times 10^6/\text{mL}$) correspondem a 33% das células mononucleares ($2,61 \times 10^6/\text{mL}$). 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, obtida neste ensaio, foi de 11,09%. 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 (KONG et al., 1997; ALLEN & HENSHAW, 2001).

A densidade populacional de células CD34⁺ é proporcional à capacidade de reconstituição hematopoética após o transplante de células-tronco (SIENA et al., 1989). Um importante estudo sobre transplante de medula óssea (TMO) em cães, relatou que houve recuperação hematopoética após o TMO autólogo com 1,6 a 3,4 x10⁶ células CD34⁺/kg e TMO alogênico com 1,75 a 6,8 x10⁶ células CD34⁺/kg. Cães que receberam menos de 1,0 x10⁶ CD34⁺/kg 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 x 10⁶ CD34⁺/kg (CREEVY et al., 2003). O transplante de sangue periférico mobilizado (TSPM) com G-CSF e/ou SCF com 4,6 x10⁶ células CD34⁺/kg permitiu a reconstituição hematopoética dos cães (SANDMAIER et al., 1996), sendo uma alternativa ao TMO, devido à facilidade na colheita e à rapidez de recuperação granulocitária e plaquetária.

A quantidade de células-tronco no SCU de cães (3,38 ± 2,72 células CD34⁺ x10⁶/kg), obtida neste ensaio, foi semelhante àquela obtida na medula óssea (BRUNO et al., 1999; 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 a 3,4 x10⁶/kg), para reconstituição hematopoética em cães (GENGOZIAN, 2000). Entretanto, a condução de novos estudos é importante para avaliar a viabilidade da aplicação clínica do SCU de cães como fonte de células-tronco.

VII CONCLUSÕES

O método aplicado para coleta de sangue do cordão umbilical de cães permitiu a quantificação das células sangüíneas e células-tronco CD34⁺ do referido cordão.

Os valores hematológicos do SCU, exceto o VCM e o número de plaquetas, apresentaram-se menores que àqueles de cães recém-nascidos e adultos.

Apesar do volume escasso de SCU (1325 µL), a quantidade de células CD34⁺ no sangue do cordão umbilical canino ($3,38 \pm 2,72$ CD34⁺ $\times 10^6$ /kg) 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.

VIII REFERÊNCIAS*

- ABONOUR, R. et al. Autologous transplantation of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells selected by immunomagnetic procedures in patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 22, n. 10, p. 957-963, 1998.
- 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.
- ADEMOKUN, J.A. et al. Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 19, n. 10, p. 1023-1028, 1997.
- AKIYAMA, Y. et al. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. **The Journal of Neuroscience**, New York, v. 22, n. 15, p. 6623-6630, 2002.
- ALISON, M.R. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, London, v. 406, n. 6793, p. 257, 2000.
- 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.
- ANDREWS, R.G et al. CD34⁺ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. **Blood**, New York, v. 80, n. 7, p. 1693-1701, 1992.
- APPELBAUM, F.R. et al. Cure of malignant lymphoma in dogs with peripheral blood stem cell transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v. 42, n. 1, p. 19-22, 1986.
- ARINZEH, T.L. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume**, Boston, v. 85-A, n. 10, p. 1927-1935, 2003.

* ABNT – agosto 2002 – NBR 6023.

- ARMITAGE, S. et al. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 20, n. 7, p. 587-591, 1997.
- 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.
- AUFDERHAAR, U. et al. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking. **Journal of Perinatal Medicine**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 317-322, 2003.
- AUSTIN, T.W.; LAGASSE, E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 120, n. 1, p. 131-135, 2003.
- BADIAVAS, E.V. et al. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 196, n. 2, p. 245-250, 2003.
- 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.
- BENITO, M.A. et al. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 33, n. 7, p. 675-690, 2004.
- BENSINGER, W.I. et al. Transplantation of allogeneic CD34⁺ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy. **Blood**, New York, v. 88, n. 11, p. 4132-4138, 1996.
- BERENSON, R.J. et al. Antigen CD34⁺ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 81, n. 3, p. 951-955, 1988.
- BHATTACHARYA, V. et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34⁺ bone marrow cells. **Blood**, New York, v. 95, n. 2, p. 581-585, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 903/GM em 16 de agosto de 2000**. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/PORT2000/GM/GM-903.htm>. Acesso em 19 ago. 2004.

- BREIDER, M.A. et al. Long terms effects of bone marrow transplantation in dogs with mucopolysaccharidosis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 134, n. 3, p. 677-692, 1989.
- 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 multi-lineage hematopoiesis. **Biology and Blood Marrow Transplantation**, Baltimore, v. 7, n. 10, p. 543-551, 2001.
- BYRNE, K.M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.
- CHASIRIPOOMKERE, 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.
- CHRISTENSEN, R.D.; HARPER, T.E.; ROTHESTEIN, G. Granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) in term and preterm neonates. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 109, n. 6, p. 1047-1051, 1986.
- COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 137-154, 1994.

- COHEN, Y.; NAGLER, A. Umbilical cord blood transplantation - how, when and for whom? **Blood Reviews**, Edinburgh, v. 18, n. 3, p. 167-179, 2004.
- CORNACCHIA, F. et al. Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 108, n. 11, p. 1649-1656, 2001.
- CORNETTA, K. et al. Rapid engraftment after allogeneic transplantation using CD34-enriched marrow cells. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 21, n. 1, p. 65-71, 1998.
- 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.
- DYCE, K.M. et al. **Tratado de anatomia veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 294-302.
- EMERSON, S.G. et al. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 76, n. 3, p. 1286-1290, 1985.
- FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.
- FERRARI, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, Washington, v. 279, n. 5356, p. 1528-1530, 1998.
- FORRESTER, L.M. et al. Long-term reconstitution of the mouse hematopoietic system by embryonic stem cell-derived fetal liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 17, p. 7514-7517, 1991.

- GASPER, P.W. The hemopoietic system. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 11, p. 63-68.
- GASPER, P.W.; THRALL, M.A. Hemopoietic stem cell transplantation. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **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.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap.16. p. 91-96.
- GILMORE, G.L. et al. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 28, n. 11, p. 1297-1305, 2000.
- GLUCKMAN, E.; ROCHA, V.; CHASTANG, C. Cord blood Banking and transplantation. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 272, 1998.
- GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, 1989.
- GOERNER, M. et al. The use of granulocyte colony-stimulating factor during retroviral transduction on fibronectin fragment CH-296 enhances gene transfer into hematopoietic repopulating cells in dogs. **Blood**, New York, v. 94, n. 7, p. 2287-2292, 1999.
- GOLFIER, F. et al. Fetal bone marrow as a source of stem cells for in utero or postnatal transplantation. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 173-181, 2000.
- GRATAMA, J.W. et al. Flow cytometry enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. **Cytometry**, New York, v. 34, n. 3, p. 128-142, 1998.
- GRINDEM, C.B. Blood cell markers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 1043-1065, 1996.
- GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, Colchester, v. 116, n. 9, p. 1827-1835, 2003.

- GUSSONI, E. et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 110, n. 6, p. 807-814, 2002.
- HARRIS, D.T. et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 13, n. 2, p. 135-143, 1994.
- 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.
- HE, H. et al. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Saint Louis, v. 126, n. 2, p. 455-464, 2003.
- HERZOG, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, New York, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.
- HESS, D. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 7, p. 763-770, 2003.
- HOWS, J.M. Status of umbilical cord blood transplantation in the year 2001. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 54, n. 6, p. 428-434, 2001.
- 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.
- HUANG, S. et al. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. Adult bone marrow and mobilized peripheral blood. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 26, n. 12, p. 1162-1171, 1998.
- 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.
- IANUS, A. et al. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 111, n. 6, p. 843-850, 2003.

- JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.
- JIN, H.K. et al. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 109, n. 9, p. 1183-1191, 2002.
- KALE, S. et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 112, n. 1, p. 42-49, 2003.
- KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D.F.; HANSON, C.A.; HARTUBISE, P.E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994. p. 1.
- KESSINGER, A. et al. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. **Blood**, New York, v. 71, n.3, p.723-727, 1988.
- KNUDTZON, S. *In vitro* growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. **Blood**, New York, v. 43, n. 3, p. 357-361, 1974.
- KONG, S.S. et al. Characterization of pediatric vertebral bone marrow. **Transplantation Proceedings**, Orlando, v. 29, n. 4, p. 1955, 1997.
- KORBLING, M. et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 346, n. 10, p. 738-746, 2002.
- KOVACIC, J.C. et al. Stem-cell therapy for myocardial diseases. **Lancet**, London, v. 363, n. 9422, p. 1735-1736, 2004.
- 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.
- KURTZBERG, J. et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 335, n. 3, p. 157-166, 1996.

- LADIGES, W.C. et al. Canine models of bone marrow transplantation. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 40, n. 1, p. 11-15, 1990.
- LANSDORP, P.M. Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 187-191, 1995.
- LAROCHELLE, A. et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. **Nature Medicine**, New York, v. 2, n. 12, p. 1329-1337, 1996.
- LASKY, L.C. et al. In utero or ex utero cord blood collection: which is better? **Transfusion**, Malden, v. 42, n. 10, p. 1261-1267, 2002.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, Leipzig, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.
- 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.
- MAYANI, H.; LANSDORP, P.M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 16, n. 3, p. 153-165, 1998.
- 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.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap.163. p. 1057-1063.
- METCALF, D. Control of hematopoietic cell proliferation and differentiation. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 66a, n. 4, p. 473-486, 1981.

- MEZEY, E. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, Washington, v. 290, n. 5497, p. 1779-1782, 2000.
- MICHEL, G.; SCHWARZE, E. Embriologia. In: SCHWARZE, E. **Compendio de anatomía veterinaria**, Zaragoza: Acribia, 1970. cap.6, p. 136-143.
- MIELCAREK, M. et al. CD34 cell dose and chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Leukemia & Lymphoma**, Reading, v. 45, n. 1, p. 27-34, 2004.
- MOREL, F. et al. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen. **Blood**, New York, v. 88, n. 10, p. 3774-3784, 1996.
- M-REBOREDO, N. et al. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 26, n. 12, p. 1263-1270, 2000.
- NAKAHATA, T.; OGAWA, M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 70, n. 6, p. 1324-1328, 1982.
- NIEMEYER, G.P. et al. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 29, n. 6, p. 686-693, 2001.
- NIKISCHIN, W. et al. The influence of mode of delivery on hematologic values in the umbilical vein. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, v. 43, n. 2, p. 104-107, 1997.
- NODEN, D.M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1990. 399p.
- OKAMOTO, R. et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. **Nature Medicine**, New York, v. 8, n. 9, p. 1011-1017, 2002.
- ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, London, v. 410, n. 6829, p. 701-705, 2001.
- PAFUMI, C. et al. Influence of the kind of delivery on umbilical cord blood collection. **Haematologia**, Budapest, v. 31, n. 4, p. 341-345, 2002.

- PATTERSON, D.F. Companion animal medicine in the age of medical genetics. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2000.
- PÉREZ-SIMON, J.A. et al. Minimal number of circulating CD34⁺ cells to assure successful leukapheresis and engraftment in autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. **Transfusion**, Malden, v. 38, n. 4, p. 385-391, 1998.
- PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Washington, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.
- QUAINI, F. et al. Chimerism of the transplanted heart. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 346, n. 1, p. 5-15, 2002.
- QUESENBERRY, P.J. et al. Stem cell plasticity: an overview. **Blood Cells Molecules & Disease**, Orlando, v. 32, n. 1, p. 1-4, 2004.
- QUIRKE, P.; DYSON, J.E.D. Flow cytometry: methodology and applications in pathology. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 149, n. 2, p. 79-87, 1986.
- RATAJCZAK, M.Z. et al. CD34⁺, kit⁺, rhodamine 123 (low) phenotype identifies a marrow cell population highly enriched for human hematopoietic stem cells. **Leukemia**, Baltimore, v. 12, n. 6, p. 942-950, 1998.
- REBEL, V.I. et al. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. **Blood**, New York, v. 87, n. 8, p. 3500-3507, 1996.
- REVEL, T. et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs. **Blood**, New York, v. 83, n. 12, p. 3795-3799, 1994.
- RICE, H.E. et al. Human fetal liver hematopoietic cell expansion with a novel bioreactor system. **Transplantation Proceedings**, Orlando, v. 26, n. 6, p. 3338-3339, 1994.
- RICHMAN, C.M. et al. Purification and characterization of granulocytic progenitor cells (CFU-C) from human peripheral blood using immunologic surface markers. **Blood**, New York, v. 51, n. 1, p. 1-8, 1978.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 2003. 481p.
- RUBINSTEIN, P. et al. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Blood**, New York, v. 81, n. 7, p. 1679-1690, 1993.

- 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.
- RUBINSTEIN, P. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 22, p. 10119-10122, 1995.
- 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.
- SCHOTS, R. et al. The absolute number of circulating CD34⁺ cells predicts the number of hematopoietic stem cells can be collected by apheresis. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 17, n. 4, p. 509-515, 1996.
- 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.
- SIMMONS, P.J et al. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 389, n. 2, p. 271-280, 1994.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, 1987. p. 593.
- SOLVES, P. et al. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 31, n. 4, p. 269-273, 2003.
- 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.

- SPARROW, R.L. et al. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. **Transfusion**, Malden, v. 42, n. 2, p. 210-215, 2002.
- STAMM, C. et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**, London, v. 361, n. 9351, p. 45-46, 2003.
- STELZNER, M. et al. Identification of optimal harvest sites of ileal stem cells for treatment of bile acid malabsorption in a dog model. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 516-522, 2003.
- STORB, R. et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. **Blood**, New York, v. 89, n. 8, p. 3048-54, 1997.
- STORB, R. et al. Current and future preparative regimens for bone marrow transplantation in thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 850, n. 1, p. 276-287, 1998.
- SURBEK, D.V. et al. Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increase cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 183, n. 1, p. 218-221, 2000.
- 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.
- TANG, P.H. Controversy on adult stem cell plasticity and rules governing the use of fetal tissue in China. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 143, n. 4, p. 199-200, 2004.
- THEISE, N. et al. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 30, n. 11, p. 1333-1338, 2002.

- THILAGANATHAN, B. et al. Subpopulations of CD34-positive haematopoietic progenitors in fetal blood. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 634–636, 1994.
- THOMAS, E.D. Historical Review: a history of haemopoietic cell transplantation. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 105, n. 2, p. 330-339, 1999.
- TSE, H.F. et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. **Lancet**, London, v. 361, n. 9351, p. 47-49, 2003.
- 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.
- VENDITTI, A. et al. Enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells for clinical transplantation: comparison of three different methods. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 24, n. 9, p. 1019-1027, 1999.
- VERFAILLIE, C.M. Hematopoietic stem cells for transplantation. **Nature Immunology**, New York, v. 3, n. 4, p. 314-317, 2002.
- 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.E. Umbilical cord blood stem cell transplantation. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, New York, v. 15, n. 2, p. 169-174, 1993.
- 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.
- WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 31, n. 2, p. 72-82, 2002.
- WUNDER, E. et al. Report of the European workshop on peripheral blood stem cell determination and standardization-Mulhouse, France. **Journal of Hematotherapy**, New York, v. 1, n. 2, p. 131-142, 1992.

YAMADA, T. et al. Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 79, n. 10, p. 830-833, 2000.

ZANCO, N.A. **Pesquisa anatômica das artérias e veias do funículo umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758).** 1988. 187f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.