



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO,
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE CULTIVO DE CÉLULAS-
TRONCO - BIO CELL E UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

GLEYKA JAMILLYS SANTANA DA SILVA

RECIFE/PE - 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO,
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE CULTIVO DE CÉLULAS-
TRONCO - BIO CELL E UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Trabalho realizado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária, com orientação da Profa. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo.

RECIFE/ PE - 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO,
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE CULTIVO DE CÉLULAS-
TRONCO - BIO CELL E UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Trabalho de Conclusão de Curso elaborado por:

GLEYKA JAMILLYS SANTANA DA SILVA

Relatório aprovado em 22/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo (Orientadora)
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Moacir Bezerra de Andrade
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

M. V. Maria Sheila da Silva Ferreira

IDENTIFICAÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

Nome da aluna: Gleyka Jamillys Santana da Silva

Curso: Graduação em Medicina Veterinária

Tipo de estágio: Curricular

Área de conhecimento: Clínica Cirúrgica

Locais do Estágio:

¹ Biocell

Endereço: Brasília SMPW Qd, 05conj. 05 lote 01- Casa – C, Brasília/Distrito Federal, CEP: 71.735 – 505.

Email: comunicacao@labbiocell.com

Telefone: (61) 3382-7407

Supervisor: Patrícia Malard

Função: Médica Veterinária

² Universidade de Brasília - Hospital Veterinário de Pequenos Animais

Endereço: UnB - Asa Norte, Brasília/Distrito Federal, CEP: 70.636-200.

Email: dra.paulagalera@gmail.com

Telefone: (61) 3107-2801

Supervisor: Professora Doutora Paula Galera

Função: Professora do Magistério Superior

Período de realização:

¹ 02/10/2017 a 31/10/2017

² 01/11/2017 a 22/12/2017

Total de horas: 420 horas

Dedico aos meus pais Gilvana e José (in memoriam) a conclusão do curso.

Vocês são minha maior inspiração!

AGRADECIMENTOS

Ao meu maior **Inspirador**, ratifico minha pequena coragem que chegou ao céu e voltou em forma de vida abençoada, plena de graça e livramentos. Gratidão, **Eterno!** A Sua benevolência, amor e misericórdia me animam para continuar a estrada pedregosa, porém “dolce e felice” da vida!

Minha mãe Gilvana Santana, a ela toda a minha gratidão. Mulher forte, melhor exemplo de generosidade e bondade que já existiu. Costumo dizer, até hoje, aos meus amigos que ela é a melhor mãe do mundo...eles concordam comigo e isso é lindo! Obrigada por todas as realizações que só foram possíveis graças ao seu empenho. Obrigada por todos os “nãos” e todos os “sins” que a sua sabedoria plenamente soube dar a esta filha orgulhosa da sua genitora.

Gratidão ao **meu pai José Pequeno da Silva** que antes de partir deixou uma filha bem encaminhada nos estudos e na vida, graças a sua persistência em educar-me com maestria. Para ele eu dedico a conclusão da minha primeira graduação.

Minha grande família Santana, são muitos, são raros e são unidos. Obrigada por cada instante que me ajudaram a persistir nos meus sonhos. Não esquecerei jamais toda a dedicação de cada um quando passei pelo momento mais difícil de minha vida. Deus os abençoe!

Gratidão a **Toni Nhaga** que das formas mais inusitadas esteve ao meu lado, na alegria e na tristeza e que assim seja para o resto de nossos dias. Amém!

Gratidão a **UFRPE**, que acolheu, como uma mãe, os últimos quase oito anos de minha vida acadêmica. Cresci, sofri, aprendi e amei nessa Universidade que abre portas. Portas internacionais, inclusive. Obrigada por me formar profissionalmente e pessoalmente, Rural! Obrigada pelos intercâmbios! Obrigada!!!!!!

Gratidão ao **Departamento de Medicina Veterinária**, que nas passagens de gestores, sempre me ajudaram a resolver os problemas da vida acadêmica.

Obrigada, mestra! Minha queridíssima orientadora **Grazielle Aleixo**, sem dúvidas, eu a levarei para a vida. A sua paciência, profissionalismo e dedicação a família e a docência me inspiram! Sempre e para além de agradecimentos teóricos serei grata!

Gratidão aos meus professores orientadores de outrora **Lilian Silvestre e Moacir Bezerra**, dos projetos no decorrer do curso e dos desesperos pré e pós-relatórios de projetos... Enfim, eu os admiro muito!

Meu agradecimento especial à médica veterinária **Maria Sheila Ferreira** que pacientemente me atendeu em todos os momentos que a requisitei na confecção do meu trabalho de conclusão de curso. Obrigada por toda orientação e humildade!

Gratidão a **minha amiga Rosélia Araújo e sua família** por ter me acolhido em Brasília. Todo esforço que fizeram para me receber e tornar os três meses de estágio mais acolhedores foi louvável! Deus abençoe vocês!

Gratidão a **Bio Cell, Lucas Santana, Patrícia Carvalho, Patrícia Malard e Hilana Brunell**. Vocês são a minha saudade de Brasília! Gratidão por todo conhecimento que me passaram sobre células-tronco! Eu volto!

Aos **meus amigos** da vida, da UFRPE, da escola, das viagens, da igreja, dos trabalhos sociais, da África, da Europa e de cada cantinho que eu passei... GRATIDÃO!

Muita gratidão a **todos os animais**, àqueles que emprestaram suas vidas para que eu pudesse aprender, àqueles que morrem para que pessoas possam comê-los, àqueles que são curados por intermédio da profissão que eu escolhi, àqueles que morrem de fome e dor abandonados nas ruas... TODOS OS ANIMAIS, eu os agradeço muito! E para eles dedicarei minha carreira profissional!

Obrigada aos meus eternos amados de quatro patas **Negão, Paloma e Fadinha**, não tenho palavras para a saudade... O amor nos une!

Obrigada ao **meu afrodog Bruno** que está ao meu lado enquanto escrevo esses agradecimentos, eu o amo!

Gratidão a **Belinha**, minha amada de quatro patas que luta para viver e me inspira tanto!
Enfim... Obrigada, **Universo!**

Per essere felice, toglie le parole “se solo” e sostituisce invece con le parole “la prossima volta”.

Tradução: Para ser feliz, apaga a palavra “se só” e substitui com a palavra “a próxima vez”.

(Smiley Blanto)

RESUMO

A biotecnologia animal e a medicina regenerativa estão intimamente relacionadas com os avanços das pesquisas em terapia celular. As células-tronco mesenquimais, caracterizadas por sua capacidade de diferenciação e autorrenovação, estão sendo utilizadas na Medicina Veterinária com grande sucesso para o tratamento de diversas afecções. Para conhecer os processos de obtenção das células-tronco desde o isolamento, amplificação, diferenciação, criopreservação e descongelamento, além de suas aplicações clínicas, o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no Hospital Veterinário da UnB e no Laboratório de Cultivo de Células-Tronco da empresa Bio Cell. A Bio Cell é uma empresa privada pioneira no uso de células-tronco no Brasil, com laboratório também nos EUA que asseguram a qualidade da terapia celular empregada nos tratamentos de lesões e doenças degenerativas. O presente trabalho descreve as atividades desenvolvidas no laboratório e nas aplicações clínicas da célula-tronco, viabilizando uma experiência científica, pessoal e profissional única.

Palavras-chave: Terapia celular, medicina veterinária e célula mesenquimal.

ABSTRACT

Animal biotechnology and regenerative medicine are closely related to advances in cell therapy research. The mesenchymal stem cells, characterized by their capacity for differentiation and self-renewal, are being used in Veterinary Medicine with great success for the treatment of several affections. In order to know the processes of obtaining the stem cells from the isolation, amplification, freezing, differentiation and thawing, in addition to its clinical applications, the Mandatory Supervised Stage (ESO) was performed at the Veterinary Hospital of UnB and in the Laboratory of Stem Cells of Bio Cell. Bio Cell is a pioneering private company in the use of stem cells in Brazil, with a laboratory also in the USA that assures the quality of cellular therapy used in the treatment of lesions and degenerative diseases. The present work describes the activities developed in the laboratory and in the clinical applications of the stem cell, making possible a unique scientific, personal and professional experience.

Keywords: Cell therapy, veterinary medicine and mesenchymal cell.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1- Paramentação com EPI's em laboratório de cultivo celular.	22
Figura 2- Tecido adiposo em solução PBS após lavagem.	26
Figura 3- Maceração de tecido adiposo.	27
Figura 4- Material ressuspendido em tubo de microcentrifugação para análise de concentração celular.	28
Figura 5- Demonstração microscópica de células-tronco em Câmara de Neubauer.	29
Figura 6- Depósito de meio DMEM em tubo cônico para cultivo celular.	30
Figura 7- Células-tronco em câmara de Neubauer com 60% de confluência.	31
Figura 8- Garrafas posicionadas na horizontal para a ação da tripsina no tapete celular.	33
Figura 9- Seringa preparada para envio com células-tronco.	34
Figura 10 - Três tubos (vermelhos) congelados de DMEM+SBF e um tubo de PBS.	36
Figura 11- Palhetas envasadas.	36
Figura 12- Raques com palhetas congeladas.	37
Tabela 1- Escala de atividades de acompanhamento do estagiário no Laboratório de cultivo celular, no período de 02 de outubro a 31 de outubro de 2017.	24

LISTA DE ABREVIATURAS

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

EUA - Estados Unidos da América

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SFB - Soro Fetal Bovino

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

DMEM - Dulbecco modification of Minimum Essential Media

FIV - Fertilização *In Vitro*

DIF- Diferenciação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE BIO-BIOTECNOLOGIA ANIMAL E BIO CELL.....	19
3.1 Objetivos da Bio Cell	20
3.2 Estrutura física e funcionamento da Bio Cell.....	21
3.2.1 Acesso dos funcionários ao laboratório de cultivo de células tronco.....	22
4 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO	23
4.1 Atividades gerais desenvolvidas no laboratório de cultivo celular	23
4.2 Preparação dos meios de coleta de tecido adiposo.....	24
4.3 Cultivo de células-tronco de tecido adiposo.....	25
4.4.1 Isolamento	25
4.4.2 Recepção, lavagem e maceração do tecido adiposo	26
4.4.3 Digestão do tecido adiposo	26
4.3.4 Eritrólise	27
4.3.5 Lavagem das células-tronco e remoção dos debris	28
4.3.6 Análise da concentração celular	28
4.4 Início do cultivo <i>in vitro</i> das células-tronco	29
4.5 Feeding do cultivo <i>in vitro</i>	30
4.6 Envio das células-tronco.....	31
4.6.1 Preparação do Meio de Transporte.....	31
4.6.2 Rotulagem das Seringas	32
4.6.3 Repique de células-tronco.....	32
4.6.4 Envase das células-tronco	33
4.7 Controle de qualidade das células-tronco cultivadas	34
4.7.1 Análise dos marcadores moleculares em citometria de fluxo	35
4.7.2 Diferenciação Celular Específica para Osteoblasto	35
4.8 Congelamento celular.....	35
4.9 Descongelamento celular	37
5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NAS CLÍNICAS VETERINÁRIAS	38
5.1 Solicitação de terapia com células-tronco.....	38
5.2 Acompanhamento de aplicação.....	39
5.3 Orientações pós-aplicação.....	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7 REFERÊNCIAS	40
8 ANEXOS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O curso de bacharelado em Medicina Veterinária é composto por 11 períodos, sendo o 11º o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) com carga horária de 420 horas. O estudante pode executar o estágio em empresas públicas ou privadas, sob a orientação de um professor da UFRPE e supervisão *in loco* de profissional da área escolhida, os quais foram a empresa privada de células-tronco Bio Cell e a instituição pública Universidade de Brasília, no Hospital Veterinário de Pequenos Animais, setor de Clínica Cirúrgica.

O objetivo principal do estágio em Brasília foi a experiência com a utilização de células-tronco, neste sentido os dois locais de escolha se complementariam, tendo em vista a perspectiva de acompanhar o cultivo da célula no laboratório da Bio Cell e a aplicabilidade no setor de clínica cirúrgica no Hospital Veterinário da UnB, sob a supervisão da renomada Professora Doutora Paula Galera.

No período destinado a UnB, de 01 de novembro a 22 de dezembro, não houve rotina com aplicação de células-tronco e o estágio, ainda que proveitoso, tomou outra direção, que foi acompanhar a rotina de cirurgias gerais de pequenos animais, tais como 24 mastectomias, 38 ovariossalpingohisterectomias terapêuticas, 35 biópsias excisionais de tumoração, 6 biópsias incisionais, cinco cirurgias oftalmológicas, quatro cirurgias ortopédicas e uma cesárea.

Então, o presente trabalho, relata a vivência enriquecedora do universo de terapia com células-tronco mesenquimais na empresa privada Bio Cell, localizada no Distrito Federal, em Brasília. A vivência no laboratório ocorreu entre o período de 02 de outubro a 31 de outubro de 2017, sob a supervisão da gestora e médica veterinária Patrícia Malard, a qual proporcionou uma rotina completa no laboratório e nas visitas às clínicas veterinárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Células-tronco, denominada em inglês de *stem cell*, são células precursoras com poder de diferenciação e auto-renovação intermináveis (WATT e HOGAN, 2000), e cuja descoberta de suas propriedades, trouxe novas perspectivas para a Medicina Veterinária (SOUZA et al., 2003). A sua pluralidade funcional é a principal vantagem da terapia, uma vez que a célula tem capacidade de diferenciação em um ou mais tipos de células especializadas como osteoblastos, adipócitos e mioblastos (PITTENGER et al., 1999). Assim, tratamentos de

inúmeras doenças e lesões como diabetes *mellitus* (LOJUDICE et al., 2008), cardiopatias (SOARES et al., 2004), lesões musculares (KOCHER et al., 2001) e lesões neurológicas alcançam bons resultados terapêuticos (YAMAKAWA et al., 2007).

Didaticamente existem dois tipos de células-tronco: células-tronco provenientes de tecidos embrionários e células-tronco adultas (LOJUDICE et al., 2008), onde as embrionárias são originadas da massa interna do blastocisto (embrião com 32 a 64 células), estas possuem capacidade ilimitada de auto-renovação e são pluripotentes, diferenciando-se em três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma. As células-tronco embrionárias também podem ser geradas a partir do zigoto (embrião com até 32 células) e são classificadas como onipotentes, uma vez que produzem os tecidos extraembrionários (além do endoderma, mesoderma e ectoderma) (VOGEL, 2000), contudo, estas células são passageiras e desaparecem poucos dias após a fertilização (ROBEY, 2000).

As células-tronco adultas podem ser multipotentes, oligopotentes ou onipotentes, dependendo de quantos tipos celulares originam e são encontradas em quase todos os tecidos. As células-tronco multipotentes possuem capacidade limitada tanto de diferenciação (originando um número limitado de tecidos), como de auto-renovação e são requisitadas de acordo com o órgão que provêm, participando da regeneração apenas daquele tecido específico (GAGE, 2000). As células-tronco oligopotentes têm capacidade ainda menor de gerar tecido e as onipotentes geram apenas célula madura, tais características tornam esses dois últimos tipos celulares às chamadas células-tronco progenitoras (MITALIPOV et al., 2009).

Durante décadas, pesquisadores estudam as alternativas de utilização dos tipos de células tronco e em 1991 foi introduzido o termo células-tronco mesenquimais (CTM), que é a célula extraída a partir de medula óssea. Posteriormente, Zuk e colaboradores (2002), introduziu o modelo de células progenitoras indiferenciada e auto- renovável, isolada a partir do tecido adiposo.

Apesar da CTM possuir menor potencial de diferenciação (plasticidade) e proliferação em comparação com as células-tronco embrionárias, a mesma é destacada em termos de abundância, fácil acesso, alto rendimento e pelo fato de estarem isentas de limitações éticas (LAM et al., 2012; TROUNSON et al., 2015).

As fontes de células-tronco mesenquimais podem ser extraídas da medula-óssea, líquido sinovial, cordão umbilical e tecido adiposo, sendo o último, atualmente a alternativa mais utilizada, uma vez que sua obtenção minimiza o trauma para o animal. A coleta de

material adiposo é realizada cirurgicamente em região subcutânea com menor irrigação sanguínea, sendo necessário aproximadamente 1 cm³ de tecido adiposo (TORRES et al., 2007; MAZZETTI et al., 2010).

Em 2005, o Comitê de Células-tronco Mesenquimais e da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu as características das CTMs, sendo elas: aderência ao plástico, uma vez que o meio de cultura são as garrafas estéreis de poliestro; expressar CD105, CD73 e CD90, e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR, sugerindo que as células-tronco mesenquimais podem ser usadas em terapia celular como células halogênicas, ou seja, células atuantes em outros hospedeiros e por fim, a capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (CARRADE e BORJESSON, 2013).

A utilização e sucesso da terapia celular dependem ainda de outros fatores, para além dos supracitados. E se deve ressaltar a importância da administração da CTM, respeitando as variáveis que implicarão na migração, ou seja, no *homing*, adequado das células (KARP e LENG, 2009).

Diversos fatores necessitam de consideração para proceder com a aplicação da célula, dentre eles a afecção, o local da lesão, influência da injúria e o estado geral do paciente. O meio de administração das células-tronco mesenquimais também pode influenciar o caminho até o órgão-alvo (RYAN et al, 2005).

A via de administração mais recomendada é a intravenosa (IV) (LI et al., 2017) através da veia cefálica devido à sua facilidade de acesso e o fato de ser pouco invasiva e de fácil difusão pelo organismo (QUIMBY et al., 2016). Pesquisas relatam que a via IV de administração da célula-tronco diminui os riscos de insuficiência renal aguda isquêmica, através do efeito parácrino (sinalização biológica de citocinas, interleucinas e fatores de crescimento ou anti-apoptóticos) (CHEN et al., 2011).

Outra via de administração é a via local, intra-articular e tendínea, por exemplo, que permitem injeção direta das células no local injuriador. Requer atenção pré e pós-cirúrgica, uma vez que o procedimento é mais traumático que a via IV (BLACK et al., 2008). O sucesso da ação terapêutica das CTMs é inerente à manutenção das mesmas na região lesionada de forma que possam atuar tanto por meio de seu efeito parácrino como por diferenciação celular, avaliando-se a concentração celular e a velocidade de infusão (BARBASH et al., 2003; LI et al., 2010).

Para obter células-tronco mesenquimais, o tecido adiposo é extraído e isolado. Fadel et al. (2011), fizeram um estudo comparativo de quatro protocolos sugeridos para o isolamento de células tronco, utilizando PBS para lavagem do material adiposo, enquanto Zuk et al. (2001), descreveram um modelo detalhado da fase inicial do isolamento que é a digestão enzimática com colagenase e posterior centrifugação para isolar a matriz extracelular. Após a digestão do tecido, ocorre a fase de filtração, que segundo Vieira et al. (2010), é primordial para a purificação e descarte de debris ainda presentes do processo de degradação da matriz extracelular, o qual deve passar por nova centrifugação para obter suspensão de células e pequenos agregados com capacidade de se aderir a um substrato sólido, garrafa de poliestro, formando uma monocamada, que é o meio de propagação de cultura celular (FRESHNER, 2006).

A transferência de células-tronco para a garrafa de cultivo pode ser realizada com meios de cultura defendidos por diferentes autores como Filioli, et al. (2011), Lee et al. (2011) e Seo et al. (2009) e devem permanecer em incubação na estufa a 37°C e 5% de CO₂.

O tempo de incubação na estufa para aderência da CTM-AD à superfície da garrafa varia de autor para autor, onde alguns citam 12 horas (MARTINELLO et al., 2011), 48 horas (CHUNG et al., 2012) ou 72 horas (TONDREAU et al., 2004.).

Após o período entre 12 e 72 horas, os autores supracitados defendem a troca de meio de cultura, processo conhecido por *feeding*, a fim de remover células não aderentes, possibilitando a aderência daquelas com afinidade ao plástico. O meio deve ser substituído três vezes por semana, com intervalos de um dia, até quando as células atingem confluência de 80%, o que normalmente ocorre em sete dias (SPENCER et al., 2012).

Na microscopia, é possível ver que a garrafa com CTMs de confluência maiores que 80% se apresentam senescentes, em processo de apoptose. A vida de uma CTM pode ser dividida em três fases - fase 1: quando completa menos de 50% da vida celular; fase 2: crescimento lento, na qual conclui 50 a 80% da sua existência; fase 3: de senescência, durante a qual há uma parada na proliferação celular (STENDERUP et al., 2003).

Para realizar o repique ou passagem, as células passam pelo processo de tripsinização e são subdividas para outras garrafas. Esse processo de tripsinização permite que as células aderidas ao plástico, sejam ressuspensas pela ação da tripsina, de modo a desagregar da placa. As células tripsinizadas, entre a terceira e quinta passagens, podem ser criopreservadas para aplicabilidade futura, seja por processo autólogo, que são células do próprio animal, ou para

procedimentos alógenos, quando as células são utilizadas em outro animal (FRESHNER et al., 2006).

Através da criopreservação, é viável realizar o armazenamento e o transporte de células, sem que haja prejuízo funcional, além de otimização de tempo para aplicação. Visando melhorar o desempenho do congelamento, a ciência criou uma substância denominada de agente crioprotetor, que protege a célula-tronco tanto no congelamento quanto no descongelamento, impedindo a formação de cristais de gelo e preservando a sua osmolaridade. O crioprotetor mais utilizado é o DMSO vista sua alta taxa de preservação da célula após o descongelamento, porém existem outros como trealose, glicerol e sacarose (JANZ et al., 2012).

Para o descongelamento, o processo de lavagem das CTMs para a retirada do crioprotetor tem sido um método frequente, devido à suposta toxicidade do DMSO, a qual se correlaciona com o volume contido no enxerto destas células (BERZ et al., 2007).

A aplicação da terapia celular com células-tronco na Medicina Veterinária, portanto, vem se afirmando com o decorrer dos anos em consequência dos estudos cada vez mais aprofundados, com altos índices de segurança e bons resultados no tratamento de doenças degenerativas, lesões musculares e epiteliais (BRITO et al., 2010).

3 DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE BIO-BIOTECNOLOGIA ANIMAL E BIO CELL

BIO – Bio Tecnologia Animal foi fundada em 2000, após pesquisas direcionadas a inovação biotecnológica na Medicina Veterinária. A empresa é formada por cinco veterinários especializados em reprodução animal e biologia celular. Atualmente, dispõe de diversos programas de desenvolvimento animal da medicina genética e veterinária, tais como: transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV), criopreservação de embriões, andrologia, ultrassom de análise reprodutiva e terapia com células-tronco, sendo esta última, o foco deste trabalho.

No ano de 2004 a empresa iniciou o isolamento de células-tronco e cultivo *in vitro*, utilizando tecido adiposo e de medula óssea com CTMs, o que permitiria a reparação de tecidos lesados propendendo regeneração e recuperação de suas originais funções fisiológicas. Foi a partir desse modelo que surgiu a Bio Cell em fundição com a Bio-Biotecnologia Animal.

Em 2013 a Bio Cell expandiu para os Estados Unidos, e em conjunto com o Centro Internacional de Biotecnologia/MOFA GLOBAL, detém seu próprio controle de qualidade nos EUA. A Bio, como é chamada a fusão das duas vertentes da empresa, está localizada em um condomínio no Setor de Mansões Park Way (SMPW) de Brasília, no Distrito Federal. A mesma é composta por dois laboratórios: laboratório de cultivo de células-tronco, no qual responde tecnicamente o biólogo Lucas Santana e o laboratório de fertilização *in vitro* (FIV), sob a responsabilidade técnica do médico veterinário Luiz Gustavo Araújo. Compõe ainda a estrutura da Bio o setor de esterilização, um almoxarifado e a copa para os colaboradores.

Na área administrativa das duas empresas, atualmente, a médica veterinária Patrícia Malard está como Gestora Administrativa, enquanto que Luis Mauro Queiroz, é Consultor de Pesquisa e Desenvolvimento, Diretor de Embriologia e Tecnologia em Células-Tronco da MOFA – *Global* (sediada em Verona, WI/EUA) e coordenador das atividades comerciais e de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, associado ao controle de qualidade. O médico veterinário Maurício Peixer é o Gestor Executivo da BIO Biotecnologia Animal, sendo responsável por coordenar as atividades de produção *in vitro* de embriões. A empresa ainda possui gerência administrativa, assistência de suprimentos, logística, assistência financeira, assistência no processamento de dados e auxiliar de serviços gerais.

A integralização da empresa é notável, pois os setores possuem suas funções e objetivos discriminados e bem definidos, assim sendo, foi possível vivenciar a rotina do laboratório de células tronco Bio Cell com bastante aprofundamento, enriquecendo o conhecimento teórico e prático do tema pretendido no estágio.

3.1 Objetivos da Bio Cell

Durante os dias de estágio, foi possível perceber o compromisso da empresa com o cumprimento dos objetivos que a caracterizam. São estes:

- Cultivar células-tronco viáveis para a terapia do animal;
- Habilitar banco de células saudáveis de espécie canina, felina e equina, as quais poderão ser utilizadas com segurança e qualidade;
- Propiciar ambiente adequado para a realização de experimentos e
- Oferecer suporte técnico nos experimentos parceiros do laboratório.

3.2 Estrutura física e funcionamento da Bio Cell

O local de funcionamento da empresa é um espaço localizado em um condomínio comercial e com todos os ambientes integralizados:

- a. Recepção: área destinada ao atendimento inicial de clientes, fornecedores e entrada para os laboratórios, bem como para as salas administrativas.
- b. Área administrativa: Possui uma sala de coordenação, sala de técnico-administrativos (setor financeiro, setor de qualidade e setor logística).
- c. Sala de computadores: Nesta sala os técnicos possuem escritórios para a produção teórica do laboratório, além de armários de arquivos contendo pastas com informações dos animais do banco de células-tronco, bem como documentações referentes ao uso da célula, como termo de solicitação de compra, termo de adesão, exames pré e pós-utilização e controle de célula utilizada.
- d. Área de entrada para os laboratórios: área onde os profissionais vestem roupas limpas de uso exclusivo do laboratório e colocam os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs).
- e. Corredor descontaminado: É o corredor que dá acesso ao laboratório de cultivo celular, laboratório de meios e laboratório de FIV. Neste local os colaboradores devem estar descontaminados, com vestimentas próprias para o laboratório, além de EPI's e utilizar dois pares de pró-pés.
- f. Laboratórios: Laboratório de Células-Tronco, Laboratório de Meio e Laboratório de FIV.
- g. Área de armazenamento de material limpo: Nesta área, dentro do setor de laboratórios, os materiais limpos e esterilizados ficam armazenados e apenas os técnicos têm acesso, objetivando controle de entrada e saída dos materiais utilizados.
- h. Sala de lavagem e área de recolhimento: Localizado na parte externa da empresa, com entrada e saída separadas das outras áreas. Local de lavagem, desinfecção e esterilização dos materiais de laboratórios. Este setor é equipado com uma autoclave, dois lavatórios sendo um para itens contaminados e outro para componentes lavados com detergente neutro e que seguirão para a autoclave. Após a esterilização, os materiais eram levados para a área de armazenamento de material limpo.
- i. Banheiro interno: Banheiro para uso exclusivo dos profissionais do setor administrativo e técnicos.

- j. Área de vivência: Os colaboradores utilizam a área para momento de lazer e de realizar suas refeições.

3.2.1 Acesso dos funcionários ao laboratório de cultivo de células tronco

Para atender as normas de biossegurança ao entrarem no laboratório, o estagiário, assim como todos os funcionários, deveria estar vestido com fardamento específico da empresa que era higienizado e descontaminado no próprio setor. Também não era permitido acesso ao laboratório sem o uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs), composto por jaleco azul estéril, um par de pró-pés para entrar no corredor descontaminado e dois pares para entrar no laboratório de cultivo de células-tronco, touca descartável, um par de luvas e máscara descartável (Figura 1)



Figura 1- Paramentação com EPI's em laboratório de cultivo celular.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Para realizar a limpeza do laboratório, ou seja, durante os procedimentos de desinfecção e retirada de materiais de descarte, o auxiliar de serviços gerais utilizava jaleco branco, luvas nitrílicas, touca descartável e um par de pró-pés para entrar na área de laboratórios e dois pares para passar no corredor de descontaminação e entrar nos laboratórios.

Neste setor é proibido o uso de adornos como anéis, brincos, relógios, colares e a utilização de perfumes ou outro cosmético com fragrância, de modo que o cultivo celular pudesse sofrer alterações por sensibilidade ao odor.

4 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

As atividades foram desenvolvidas em dois momentos, de acordo com a rotina da empresa: no laboratório de células tronco da Bio Cell, com o auxílio do biólogo Lucas Santana, responsável técnico do cultivo celular, e em acompanhamentos às clínicas veterinárias com as médicas veterinárias Patrícia Malard e Hilana Brunell para auxiliar o profissional que requisitou a aplicação de célula tronco na região de Brasília.

Na clínica veterinária, a equipe Bio Cell também dava suporte para o tutor do animal, entregando-lhe o Termo de Consentimento Livre, no qual constavam-se as orientações sobre os devidos cuidados pós-aplicação para melhor proveito da terapia. (Anexo 1).

4.1 Atividades gerais desenvolvidas no laboratório de cultivo celular

Durante o período de um mês, o estagiário acompanhou todo o processo de cultivo da célula-tronco e os protocolos internos do laboratório para ampliar os seus conhecimentos na terapia celular (Tabela 1).

É importante salientar que para manter a política de sigilo dos procedimentos intrínsecos à Bio Cell, o estagiário assinou um termo de confidencialidade que assegura ambas as partes e permite o relato de atividades pertinentes ao desenvolvimento de conhecimento teórico e prático, desde que as medidas exatas de soluções e alguns procedimentos não sejam divulgados fora das dependências do laboratório Bio Cell e portanto, não poderão ser divulgadas no presente relatório.

Tabela 1- Escala de atividades de acompanhamento do estagiário no Laboratório de cultivo celular, no período de 02 de outubro a 31 de outubro de 2017.

Semana	Período	Procedimento
1	02/10 a 04 /10	Preparação de meios, e cultivo de células-tronco e tecido adiposo
1	05/10 a 06 /10	Isolamento de células-tronco do tecido adiposo e início do cultivo <i>in vitro</i>
2	09/10 a 11/10	<i>Feeding</i> do cultivo <i>in vitro</i> e envio de células-tronco/Acompanhamento de aplicação
2	13/10	Congelamento de células-tronco em palhetas
3	16/10 a 18/10	Descongelamento de células-tronco em palheta e aplicação imediata
3	19/10 a 20/10	Audições internas e visitas do MAPA no laboratório
4	23/10 a 25/10	Controle de qualidade das células-tronco cultivadas
4	26/10 a 27/10	Acompanhamento de aplicação
5	30/10 a 31/10	Acompanhamento de aplicação

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Foi esperado que o estagiário acompanhasse todas as atividades a ele pertinentes e pretendidas durante as quatro semanas de estágio. O expediente regular ocorreu das 8:00 às 18:00 horas, com intervalo para almoço entre as 12:00 e 13:00 horas. Por ventura, havendo necessidade de estender o horário para a melhor compreensão das etapas do laboratório, foi permitido ao estagiário permanecer no laboratório após as 18:00 horas.

Em dias de audições internas e visitas do MAPA, o estagiário permaneceu no escritório de técnicos, acompanhando os estudos clínicos que a Bio Cell executa, afim de produzir cientificamente a rotina do laboratório.

4.2 Preparação dos meios de coleta de tecido adiposo

Na primeira semana de estágio, como em todas as outras, acompanhou-se o técnico nos protocolos e procedimentos de cultivo celular, auxiliando-o de forma a adquirir o máximo de conhecimento possível sobre a célula-tronco.

A empresa Bio Cell é responsável pelo envio de kits com três tubos embalados contendo os meios de coleta que servirão para a coleta de tecido adiposo referente ao cultivo de CTM's no modelo autólogo, ou seja, quando a célula será recebida pelo próprio doador de

tecido. Para tanto, fez-se necessário o preparo dos meios de coleta no laboratório, os quais foram enviados a clínica veterinária.

A preparação dos meios de coleta do tecido adiposo bem como todos os procedimentos descritos em fluxo laminar, no decorrer do relatório, foram executados após higienização da bancada com álcool a 70%.

Três tubos cônicos de 50 mL formavam o conjunto de envio para o médico veterinário responsável por realizar o procedimento cirúrgico de coleta. Para discriminar cada tubo, os mesmos eram identificados com etiquetas escritas, respectivamente, Transporte, Lavagem 1 e Lavagem 2.

Para cada conjunto de três tubos cônicos, foi adicionado uma alíquota de Soro Fetal Bovino (SFB), suplemento para meio de cultura, e solução PBS que é uma solução tampão útil no processo de lavagem e proteção da célula-tronco, além do indicador de pH Phenol Red. O conjunto de tubos eram embalados em saco de autoclave, sempre vedados com plástico filme e depois embalados novamente, somado a um tubo para coleta de sangue para sorologia. Ao final, o técnico armazenava o kit na geladeira com data de fabricação e validade. No dia de envio, o kit era armazenado em uma caixa térmica, higienizada com álcool a 70% e identificada como “Kit de coleta para tecido adiposo”.

A caixa térmica contendo o conjunto com três tubos duplamente embalados, gelo reciclável e plástico bolha (nos espaços vazios), era enviada para o departamento de logística, responsável pelo envio do material à clínica veterinária que realizará a coleta de tecido adiposo.

4.3 Cultivo de células-tronco de tecido adiposo

A Bio Cell, não realiza a coleta cirúrgica do tecido adiposo para cultivo celular, sendo esse procedimento de responsabilidade do médico veterinário requerente da terapia no modelo autólogo. Em procedimento alógeno para o banco de células, a Bio Cell recruta doadores que terão seus custos de exames pré-coleta, procedimento cirúrgico e exames pós-coleta revertidos em isenção de possível utilização no tratamento de doenças com terapia celular.

4.4.1 Isolamento

Para proceder com o cultivo celular, fez-se necessário isolar o tecido adiposo, obtendo células-tronco viáveis para a terapia. O processo requereu técnicas de maceração, digestão

enzimática, lavagens e filtrações para obter material livre de debris e impurezas que incapacitassem a CTM de sua função.

4.4.2 Recepção, lavagem e maceração do tecido adiposo

Neste processo, o setor de logística encaminhava a caixa térmica com o kit contendo o tecido adiposo coletado à antessala do laboratório, onde era realizada a conferência do tubo de transporte (tamanho do tecido adiposo, temperatura, limpeza do frasco, presença de debris e sangue).

No fluxo laminar, o técnico, posicionava em uma raque apropriada o tubo de transporte higienizado contendo o tecido e mais três tubos cônicos de 50 mL devidamente identificados com o nome e número de série do animal os quais receberam solução PBS para a lavagem do tecido. Foram feitas três lavagens, passando de um tubo para o outro, homogeneizando lentamente afim de retirar o máximo de sangue e debris, até o último tubo de lavagem com PBS (Figura 2).

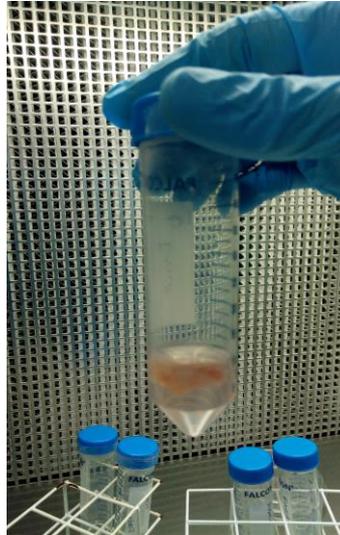


Figura 2- Tecido adiposo em solução PBS após lavagem.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

4.4.3 Digestão do tecido adiposo

Com o auxílio de uma pinça higienizada com álcool a 70%, o técnico transferiu o tecido do tubo para uma placa de petri estéril de 90x15mm.

Procedeu com a maceração do tecido adiposo em pequenos fragmentos, usando bisturi e retirou as fâscias além de outros tecidos não desejados (Figura 3).

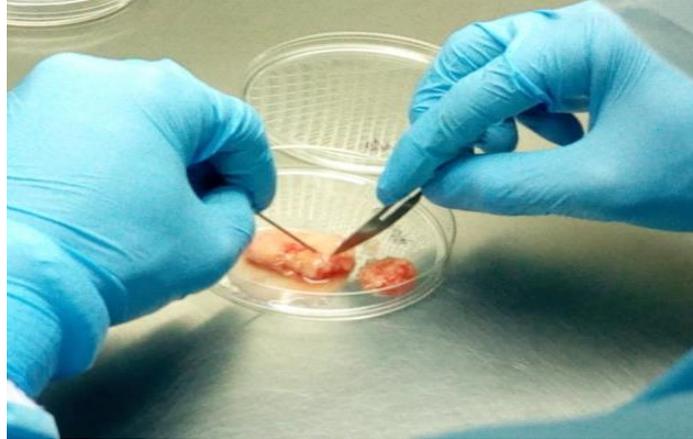


Figura 3- Maceração de tecido adiposo.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Em seguida, transferiu o tecido macerado para um tubo contendo a enzima collagenase e foi mantido por um período de 30 minutos na estufa, retirando e homogeneizando o tubo a cada cinco minutos.

Ao final deste período, removeu o tubo da estufa de estabilização e adicionou meio de cultura DMEM, homogeneizando. Posteriormente, procedeu com a filtragem do conteúdo (processo sigiloso da Bio Cell), finalizando esta etapa com a centrifugação do material na velocidade de 1250 rpm (280G a 300G), por um período de 9 minutos.

4.3.4 Eritrólise

Para assegurar que não haja a presença de glóbulos vermelhos na continuidade do processo, a célula é exposta ao meio eritrólise, uma enzima que degrada células vermelhas.

Então, após a retirada do tubo da centrífuga, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o pellet, transferindo-o para um tubo com meio eritrólise estabilizado e na sequência retornou para a centrífuga, iniciando a centrifugação na velocidade de 1250 rpm por 5 minutos.

4.3.5 Lavagem das células-tronco e remoção dos debris

Ao final do processo de eritrólise na centrífuga, deu início o procedimento de lavagem realizado com o auxílio de uma bomba pipetadora e uma pipeta sorológica descartável, para remover o sobrenadante do tubo cônico, dispensando-o e ressuspensando o pellet do tubo com meio DMEM. Em seguida, centrifugou na velocidade de 1250 rpm por 3 minutos e repetiu o procedimento de lavagem por mais duas vezes.

4.3.6 Análise da concentração celular

Após todo o processo de centrifugação das lavagens, as células-tronco foram ressuspensas com meio DMEM e logo depois foi transferida uma fração pequena do material para um tubo de microcentrifugação (Figura 4).

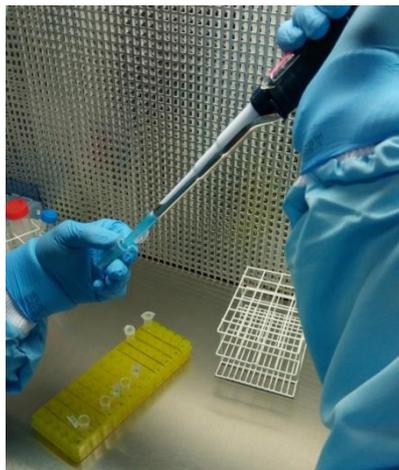


Figura 4- Material ressuspensado em tubo de microcentrifugação para análise de concentração celular.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Uma fração ainda menor de células em meio DMEM foi transferida para a Câmara de Neubauer e foi realizada a contagem das células-tronco. Para proceder a contagem celular foi utilizado um microscópio com contraste de fase.

O número de células foi contado dentro de 5 quadrantes, cada qual formado por 16 quadrados menores. Foram contadas as células que tocaram em dois lados do quadrante.

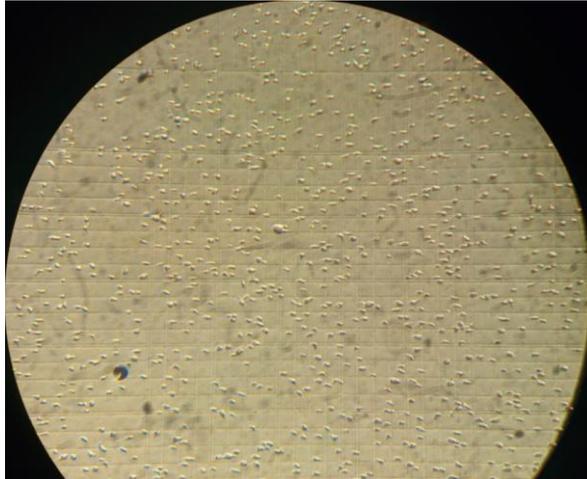


Figura 5- Demonstração microscópica de células-tronco em Câmara de Neubauer.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

4.4 Início do cultivo *in vitro* das células-tronco

O método de cultivo das células-tronco na Bio Cell está relacionado com a capacidade de aderência celular, formando uma monocamada de células. A partir desse pressuposto, as células foram cultivadas de acordo com a contagem e quantidade de células estipuladas para o tratamento do animal.

As garrafas de cultivo celular foram posicionadas verticalmente no fluxo laminar e com uma caneta permanente identificou na parede externa inferior e lateral de cada uma, o nome do animal, o número de série do tecido, a data da manipulação e a espécie do animal.

Com auxílio da bomba pipetadora e uma pipeta sorológica descartável foi depositado meio de cultura DMEM para cada garrafa (Figura 6).

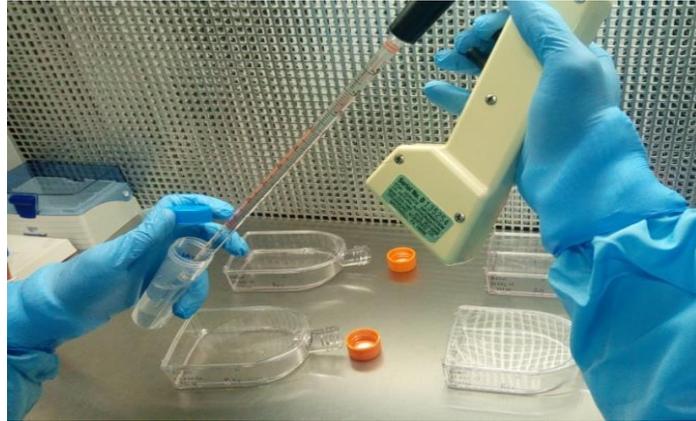


Figura 6- Depósito de meio DMEM em tubo cônico para cultivo celular.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Em seguida, o conteúdo do tubo cônico contendo as células-tronco isoladas, foi transferido com no mínimo 100.000 células para cada garrafa de cultivo celular. Essa quantidade não é exata mas sugerida pelos estudos de concentração e confluência das células-tronco.

A tampa de cada garrafa foi bem vedada para impedir contato externo e procedeu-se com a análise das características celulares no microscópio invertido com contraste de Hoffmann. Na sequência, as garrafas de cultivo celular foram encaminhadas para a estufa.

Ao final de 24 horas após o isolamento, o técnico fez a troca de meio, chamado de feeding, a fim de se eliminarem células hematopóéticas e adiposas não aderentes para obtenção somente de células-tronco mesenquimais.

4.5 Feeding do cultivo *in vitro*

O feeding do cultivo celular foi realizado a cada dois dias a partir do início de cultivo até atingir o estágio de confluência celular máximo de 70%, o qual foi alcançado com sete dias e após esse período, foi possível realizar o repique celular, promovendo a passagem ou ampliação de células-tronco para novas garrafas.

No decorrer dos dias, foi estabelecida uma análise microscópica a cada 48 horas, observando a morfologia e cinética confluência das células.

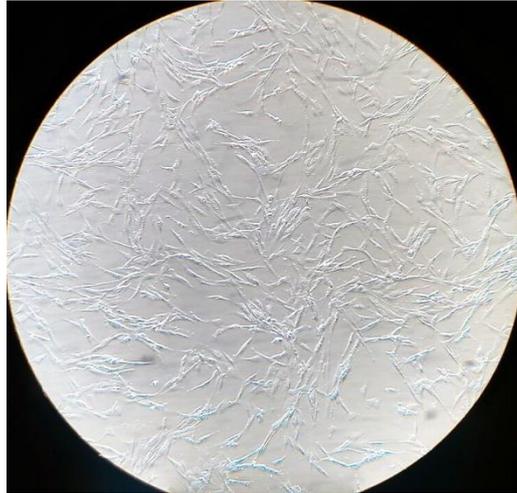


Figura 7- Células-tronco em câmara de Neubauer com 60% de confluência.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Para esse procedimento, a garrafa de cultivo celular foi retirada da estufa de CO₂, com a tampa fechada e mantida na posição horizontal sobre a bancada de fluxo laminar. Então, com o auxílio da bomba pipetadora e pipeta sorológica foi despezado o meio DMEM contido na garrafa.

Uma percepção importante desta etapa consiste no cuidado do técnico para não tocar o fundo da placa de cultivo celular com a ponta da pipeta sorológica de modo a não retirar as células da parede da garrafa.

Em seguida, o novo meio DMEM foi adicionado pela parte superior interna da placa e a garrafa posicionada para que o tapete celular ficasse submerso no meio DMEM. Ao final desse processo a garrafa de cultivo celular foi realocada na estufa de cultivo.

4.6 Envio das células-tronco

Para as células-tronco estarem aptas para o envio, foi necessário seguir algumas etapas as quais estão detalhadas a seguir:

4.6.1 Preparação do Meio de Transporte

Na bancada do fluxo laminar foi estabilizado em temperatura ambiente a quantidade necessária para envasar as células juntamente com o meio base transporte, meio este que é um segredo da empresa e preparado por um laboratório externo, o laboratório de meios. Em

seguida, o técnico adicionou soro autólogo, ou seja, do próprio animal em tratamento, ou soro halógeno em caso de um doador do banco de células-tronco congeladas do laboratório.

Na sequência, o meio foi filtrado através de um método sigiloso do laboratório para obter o máximo de pureza.

4.6.2 Rotulagem das Seringas

Todos os materiais do laboratório e as seringas que contem as células-tronco prontas para envio são rotuladas. Para tanto, preparou-se a quantidade de etiquetas com o nome do animal correspondente a quantidade de seringas que foram utilizadas para o envio.

Na bancada do fluxo laminar, cada seringa foi identificada com as etiquetas correspondentes e em seguida, acoplou-se à seringa uma agulha de tamanho específico.

4.6.3 Repique de células-tronco

O repique também chamado de método de tripsinização das células-tronco em cultivo in vitro ocorreu estrategicamente quando se obteve uma confluência celular na garrafa de cultivo entre 70% e 80%, após esse ponto as células poderiam sofrer apoptose, uma vez que não haveria mais espaço para crescimento.

Os meios utilizados (solução Tripsina/EDTA, meio DMEM e PBS) foram estabilizados, por pelo menos uma hora antes do início das atividades do repique, acondicionando-os na estufa de estabilização.

Procedeu-se com a retirada da garrafa de cultivo celular da estufa de CO₂, desprezou-se todo o meio DMEM contido na garrafa, para em seguida adicionar a solução PBS, lavando a parede da placa onde as células estavam. A solução PBS foi removida em seguida com a bomba pipetadora e pipeta sorológica pela parede da garrafa sem causar atrito na parede, impedindo que as células fossem removidas da placa.

Posteriormente, solução Tripsina/EDTA foi adicionada para desprender as células da garrafa e solução PBS, em seguida, assim, as CTMs já desprendidas puderam ser lavadas pelo PBS. O técnico ressaltou a importância de posicionar a garrafa na horizontal para que o tapete celular ficasse submerso na solução de Tripsina/EDTA (Figura 8).



Figura 8- Garrafas posicionadas na horizontal para a ação da tripsina no tapete celular.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Em seguida, a garrafa foi reposicionada na estufa, mantendo-se por um período de 2 minutos. Após esse período, avaliou-se na luz ambiente o nível de desprendimento das células da placa de cultivo celular, confirmando esta avaliação no microscópio invertido com contraste de Hoffmann. Posteriormente, a garrafa foi posicionada na vertical e adicionou-se meio DMEM, homogeneizando o conteúdo.

Em seguida, o material com as CTMs, tripsina, PBS e DMEM foi transferido para um tubo cônico e enviado para a centrifugação por três minutos.

Ao final deste período, desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado no meio de transporte para ser submetido a uma nova centrifugação de 3 minutos. Esse processo foi repetido três vezes, até restar pouco sobrenadante a ser desprezado e o máximo de pellet, o qual foi homogeneizado com o meio de transporte através da bomba pipetadora e a pipeta sorológica, dando seguimento ao processo com a transferência de uma fração microlítica do conteúdo homogeneizado para um tubo de microcentrifugação e desse, transferiu-se uma quantidade milimétrica para a Câmara de Neubauer, procedendo com a contagem celular e quantificação de células necessárias para o protocolo de tratamento da doença.

4.6.4 Envase das células-tronco

Para esta fase do repique e seguimento do envio, o técnico ajustou o volume final de meio de transporte com células-tronco de acordo com o numero de seringas necessárias para a aplicação, transferindo o conteúdo do tubo cônico de 15 mL para o criotubo.

Com o auxílio da seringa de 1 ou 5 mL e uma agulha 30 x 8 mm foi aspirado o conteúdo do criotubo e após envasar todo o meio de transporte contendo as células-tronco, trocou-se a agulha que seria utilizada para a aplicação (Figura 9).



Figura 9- Seringa preparada para envio com células-tronco.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Em seguida, a seringa contendo a célula-tronco foi embalada em saco plástico estéril e acondicionada em caixa de isopor com plástico bolha também previamente identificada contendo o número de série e nome do animal.

A caixa de isopor com as células foi disponibilizada para o Setor de Logística juntamente com o prontuário do animal.

No prontuário do animal, constava-se todos os dados de identificação do animal, o protocolo utilizado e as palhetas que foram descongeladas do banco de células, caso fosse processo halógeno (Anexo 2).

4.7 Controle de qualidade das células-tronco cultivadas

A Bio Cell elegeu dois parâmetros para controle de qualidade da célula-tronco: a análise dos marcadores moleculares, os quais determinam o poder de imunomodulação das CTMs e a diferenciação em osteoblastos, capacidade única da célula-tronco do tecido adiposo.

4.7.1 Análise dos marcadores moleculares em citometria de fluxo

Nessa etapa, uma amostra contendo meio DMEM e CTMs foi retirada da garrafa de cultivo celular e transferida para um tubo cônico de 15 mL, previamente fixado em solução de paraformaldeído (procedimento sigiloso da Bio Cell). O tubo foi vedado com plástico filme e identificado com número de série do animal. Em seguida foi enviado para posterior análise dos marcadores moleculares em citometria de fluxo. O procedimento foi realizado no laboratório nos EUA com o qual a Bio Cell tem sociedade.

Para o controle de qualidade da Bio Cell, também foram solicitados exames de cultura bacteriana, fúngica e micoplasma com o objetivo de excluir possíveis contaminações na terapia.

4.7.2 Diferenciação Celular Específica para Osteoblasto

No procedimento de diferenciação em osteoblastos, a placa de cultivo a ser utilizada foi retirada da estufa quando chegou a uma confluência entre 75 e 90%. Iniciou-se o processo de indução a diferenciação celular específica para osteoblasto desprezando o meio DMEM contido na garrafa, com cuidado para a ponta da pipeta não tocar o fundo da placa com as CTMs aderidas, e adicionando meio “DIF”, este meio foi produzido pelo laboratório de meio, contendo DMEM e os indutores de diferenciação em osteoblastos.

A garrafa de cultivo celular foi realocada na estufa e ocorreu após 48 horas o procedimento de troca do meio “DIF”.

Cada espécie possui um período para concluir a diferenciação, em cães este período é de aproximadamente 20 dias.

4.8 Congelamento celular

Depois de analisar a qualidade e o aspecto celular, as células-tronco aderidas na garrafa foram encaminhadas ao processo de congelamento com crioprotetor DMSO.

O congelamento consistiu na técnica de tripsinização das garrafas de cultura celular, centrifugação e contagem na câmara de Neubauer. Depois de obter a quantidade de células, o conteúdo foi ressuspensionado em concentração igual de meio de cultura base, DMEM mais SFB, e meio de cultura com DMSO (1:1) (Figura 10).



Figura 10 - Três tubos (vermelhos) congelados de DMEM+SBF e um tubo de PBS.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

E a solução contendo células-tronco mesenquimais e meio de congelamento, foi envazada em palhetas de 0,25 ml, na concentração de 4.000.000 de células por mL com o auxílio de uma seringa, depois foram lacradas as extremidades livres utilizando pinça hemostática aquecida em chama de lamparina. O procedimento repetiu-se com todas as palhetas restantes. (Figura 11)

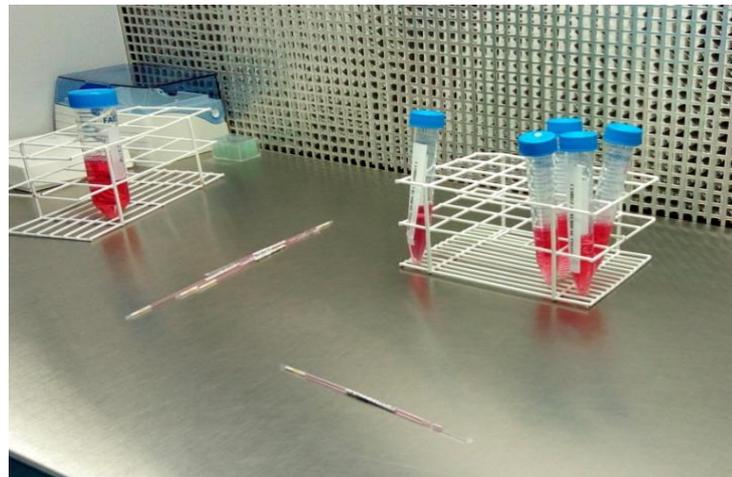


Figura 11- Palhetas envasadas.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Em seguida, as palhetas foram direcionadas para uma máquina de congelamento, a qual se trata de uma caixa de isopor de 7 litros, com uma estante (como uma moldura) de

20x12x4cm, contendo nitrogênio líquido do botijão de nitrogênio até a altura de cerca de 60% do volume interno.

Posteriormente, com auxílio de uma pinça, acondicionou-se as palhetas contendo as células-tronco congeladas nas raques identificadas com o número de série do animal as quais foram transferidas para o botijão de nitrogênio (Figura 12).



Figura 12- Raques com palhetas congeladas.
Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

4.9 Descongelamento celular

As palhetas congeladas e armazenadas em botijões com nitrogênio líquido não possuem prazo de validade, ou seja, ficam conservadas pelo tempo que o tutor desejar, no processo autólogo, em que o tutor custeia a manutenção por seis meses renováveis. Dependendo da necessidade e da patologia tratada, ocorre o descongelamento desse material. As células halógenas do banco de células são descongeladas de acordo com a demanda por terapia que requerem urgência, não sendo viável aguardar por processo autólogo ou quando o médico veterinário, em conjunto com o tutor e a Bio Cell, optam por um doador.

O descongelamento se inicia com a localização das células no botijão de armazenamento, após essa localização, as palhetas são submetidas a um banho-maria a 37°C

por 5 segundos. Depois deste procedimento, as extremidades das palhetas são cortadas para dispensar o conteúdo celular em um meio de descongelamento.

O tubo contendo a solução de descongelamento e as células, são centrifugadas, e o pellet oriundo dessa centrifugação é lavado com a mesma solução. Logo após as lavagens, a célula está pronta para uso veterinário.

5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NAS CLÍNICAS VETERINÁRIAS

Quando as aplicações de células-tronco ocorrem na região de Brasília, o procedimento é acompanhado por membros veterinários da Bio Cell, assim, foi possível acompanhar a terapia empregada para algumas doenças como úlcera de córnea, pacientes renais crônicos, sequelas neurológicas de cinomose e osteopatias.

Na clínica, o médico veterinário solicitante, junto com o proprietário do animal, recebe os gestores da Bio Cell, na pessoa de Patrícia Malard e/ou Hilana Brunell com a caixa térmica contendo a célula-tronco e se dirigem para um consultório onde a aplicação endovenosa, em sua maioria, ocorre.

5.1 Solicitação de terapia com células-tronco

A solicitação de terapia com células-tronco pode ser realizada pelo tutor ou pelo médico veterinário que, em concordância com o tutor, escolhe como proceder com o tratamento. De todo modo, o intermédio de profissional médico veterinário é necessário.

O contato era feito por e mail ou telefone a fim de obter o máximo de informações do animal, como estágio da doença, antecedentes mórbidos, ambiente em que vive, tipo de alimentação bem como inteirar o tutor da aplicabilidade e seguridade da terapia celular, reinteirando a importância da continuidade do protocolo.

Eram solicitados exames específicos, a depender da doença tratada. De modo geral, a Bio Cell solicita hemograma completo e bioquímico com dosagem de ureia e creatinina nos momentos pré e pós-aplicações da terapia celular.

A realização desses exames objetivou auxiliar no protocolo instituído, elevando a função da célula ao longo do tratamento.

5.2 Acompanhamento de aplicação

A Bio Cell acompanha a aplicação das célula-tronco através da gestora executiva Patrícia Malard e/ou da médica veterinária Hilana Brunell, visando promover para a clínica veterinária e o tutor um suporte *in loco*, permitindo assim, definir o futuro da terapia do animal junto ao profissional que solicitou a célula.

Durante o período de estágio, foram 15 acompanhamentos às clínicas veterinárias, sendo 12 aplicações bem sucedidas em cães e três em felinos.

Nos casos em que a célula é solicitada em outras cidades e estados, o setor de logística encaminha para o aeroporto e um profissional da logística da clínica em que será realizada a aplicação, recebe a célula.

Na clínica, o animal é recebido pelo médico veterinário responsável que faz a anamnese e análise dos exames previamente solicitados e enviados ao laboratório Bio Cell por e-mail para confirmar a condição adequada do paciente para o tratamento. Em seguida, o tutor deixa o consultório e o médico veterinário procede com o acesso venoso e início da fluidoterapia. Após esses procedimentos, o tutor é autorizado a voltar para o consultório para acompanhar a aplicação da célula.

Neste momento, o responsável da Bio Cell (paramentado com jaleco e luvas estéreis) retira a seringa identificada da caixa térmica e aplica no frasco de ringer com lactato que está acoplada ao equipo. A bolsa deve ser protegida da luz, uma vez que as células são sensíveis a iluminação.

O processo de aplicação das células-tronco dura em média 40 minutos, pois deve ser lenta e contínua garantindo o bem-estar do animal.

Em aplicações locais, o médico veterinário responsável pela solicitação procede com a aplicação em ambiente cirúrgico, no entanto, durante o período de estágio não ocorreram aplicações locais da terapia celular.

5.3 Orientações pós-aplicação

A aplicação endovenosa de célula-tronco é um procedimento pouco invasivo, porém, para o melhor desempenho da terapia o animal deve permanecer em repouso por três dias e receber alimentação para animal convalescente.

A resposta imediata é individual e pode ser acompanhada de fadiga, vômitos e febre. A Bio Cell realiza contato posterior com o tutor do animal no quinto e 15º dia para acompanhar a evolução de cada aplicação, que segundo o protocolo interno da empresa através de estudos estatísticos prévios, deve ser de três aplicações com intervalos de 21 dias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço das pesquisas em terapia celular, a Medicina Veterinária alavancou suas alternativas de conhecimento teórico e prático para salvar vidas. E a oportunidade de realizar o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), componente final do curso, no campo científico promissor da célula-tronco foi enriquecedor.

As células-tronco mesenquimais capacitadas em se diferenciar e autorenovar trouxeram a esperança para animais doentes renais crônicos, pacientes com sequelas de cinomose, úlcera de córnea entre outras doenças. O poder das CTMs de migrar para o sítio injuriado faz delas células heroínas, as quais ainda poderão contribuir infinitamente mais para o bem estar de animais e seres humanos.

7 REFERÊNCIAS

1. BARBASH, I.M. et al. Systemic delivery of bone marrowderived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, 108 (7):863-8, 2003.
2. BERZ, D. et al. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. **American Journal of Hematology**, Estados Unidos, v. 82, p. 463-472, jan. 2007.
3. BLACK L.L. et al. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. **Veterinary Therapeutics** 9, 192–200, 2008.
4. BRITO, H.F.V et al. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação** 2010; 8(24); 26-29.
5. CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**. 1991; 9 (5):641-50.

6. CARRADE, D.D. E BORJESSON, D.L. (2013). Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 63:207–217
7. CHEN, Y.T. et. al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. **Journal Transl Medicine**, 5;9:51, 2011.
8. CHUNG, D. et al. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. **Res Vet Sci**. 2012;92(1):66-75.
9. DE GIROLAMO L. et al. Role of autologous rabbit adipose-derived stem cells in the early phases of the repairing process of critical bone defects. **J Orthop Res**. 2013 29:100–108
10. FADEL, L.; et al. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. **Acta Cir Bras**. 2011;26:267-73.
11. FILIOLI, U. M. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. **Mol Reprod Dev**. 2011; 78 (5): 361-73.
12. FRESHNER, R. I. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 5ed. **Nova Jersey: Editora John Wiley & Sons**, cap. 1, p 3-22, 2006.
13. FUKADA, S et al. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. **Journal of Cell Science** 2002; 115: 1285-93.
14. GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, Washington, DC, v.287, p.1433-1438, Feb. 2000.
15. JANZ, F. L; et al. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants fo human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
16. KARP JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**. 2009;4(3):206-16.
17. KOCHER A.A. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med** 2001; 7:430-6.

18. LAM, MT.; LONGKER, MT. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. **J Tissue Eng Regen Med.** 2012;6 Suppl 3:s80–s86
19. LEE, WS.; SUZUKI, Y.; GRAVES, SS. et al. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2011;17(4):465-75.
20. LI L., et. al. A role for Gcn5 in cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Molecular Cell Biochemi,** 345(1-2):309-16, 2010.
21. LI, X et al. (2017). Administration of signalling molecules dictates stem cell homing for in situ regeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** 27(30), 5277–5285.
22. LOJUDICE, F.H.; SOGAYAR, M. C. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. **Ciência saúde coletiva** 2008; 13(1): 19.
23. MARTINELLO, T. et al. Canine adiposederived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Res Vet Sci.** 2011;91(1):18-24.
24. MAZZETTI M.P, Oliveira IS, Miranda-Ferreira R, Fauaz G, Ribeiro CN, Gomes PO et al (2010) Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. **Acta Cir Bras** 25:24–27
25. MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 2009;114:185–199.
26. MORI H. et al. Effets of heparin and its 6-O and- desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** Osaka, v 100, n.1, p.54-61, 2005.
27. PINTTENDER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science,** v. 284, p.143-147, 1999.
28. QUIMBY J.M., et. al. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. **J Feline Med Surg.** 18(2):165-71, 2016;.
29. ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **J. Clin. Invest.,** Thorofare, v.105, n.11, p.1489-1491, June 2000.
30. RYAN, J.M, Mesenchymal stem cell avoid alto genet regeiction. **J. Inflamm.** 2005; 2-8.

31. SEO, M.; JEONG, YH.; PARK, JR.; PARK, SB.; RHO, KH.; KIM, HK. et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **J Vet Sci.** 2009;10(3):181-7.
32. SOARES, M.B.P et al. Transplanted bone marrow stem cell repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am J Path** 2004; 164(2): 441-7.
33. SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 251-256, jul./dez. 2003.
34. SPENCER, N.D et al. *In vitro* expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. **Vet J.** 2012;191(2):231-9.
35. STENDERUP K. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone.** 2003;33(6):919-26.
36. STRAUER B.E. et al. Intracoronary human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. **Dtsch Med Wochenschr** 2001; 126: 932-8.
37. TONDREAU T; et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. **Cytotherapy.** 2004;6(4):372-9.
38. TORRES F.C. et al. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an-easy-to-find experimental source. **Aesthet Plast Surg** (2007) 31:574–578
39. TROUNSON, A.; MCDOLAND, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. **Cell Stem Cell** . 2015; 17: 11-22.
40. VIEIRA, N.M. et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplant.** 2010;19(3):279-89.
41. VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? **Science**, Washington, DC, v.287, p.1418-1419, Feb. 2000.
42. WATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. Out of the Eden: stem cells and their niches. **Science**, Washington, DC, v.287, p.1427-1430, Feb. 2000.
43. YAMAKAWA, T. et al. Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. **Cell Transplantation** 2007; 16(8): 811-22
44. ZUK, P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell** 2002;13:4279–4295
45. ZUK, P.A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.** 2001;7(2) :211-28.

8 ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre.



Termo de Consentimento livre e Esclarecido para Terapia com Células-Tronco Mesenquimais

Para fins de ordem legal, autorizo a prática dos procedimentos veterinários para aplicação de células-tronco no animal de minha propriedade, estando ciente da participação do mesmo em Pesquisa Clínica.

Declaro, ainda, estar perfeitamente ciente de todos os aspectos que envolvem os procedimentos de aplicação das células-tronco. Recebi do médico veterinário todas as informações solicitadas, bem como outras subsidiárias, conforme a seguir explicita:

- Que lhe foram detalhadamente explicadas pelo médico veterinário a natureza, a finalidade, as peculiaridades, os benefícios, os riscos e as possíveis complicações dos procedimentos;
- Que esse estudo clínico é importante para o estabelecimento da eficácia do tratamento com células-tronco;
- Que durante todo o tratamento o animal deverá ser acompanhado pelo médico veterinário;
- Que os benefícios esperados dependem da doença a ser tratada, do grau de severidade da mesma e da resposta individual de cada paciente;
- Que as medicações complementares ao tratamento e indicadas pelo médico veterinário deverão ser mantidas;
- Que, para cada doença a ser tratada, será solicitada uma relação de exames que devem ser realizados ao longo do tratamento;
- Que, como em toda intervenção médica veterinária, existe um risco excepcional de mortalidade, decorrente da própria aplicação das células ou das condições vitais do paciente;
- Que foi informado(a) estar ciente de que as aplicações das células-tronco podem ocorrer complicações durante o procedimento ou após a aplicação das células, tais como reações alérgicas durante e após a aplicação de células-tronco, alterações de pressão arterial, vômito e diarreia.
- Que cada uma das complicações e o significado de seu nome técnico lhe foi detalhadamente explicada pelo médico veterinário.
- Que essas complicações, algumas vezes, decorrem de fatores imponderáveis e imprevisíveis, tais como reações orgânicas do próprio paciente.
- Que em virtude do acima exposto, poderá ser imperativa a utilização de monitorização invasiva, sobre a qual já foi o proprietário do paciente suficientemente esclarecido (a);
- Que se ocorrerem intercorrências ou imprevistos, a equipe médica veterinária poderá adotar procedimento clínico/cirúrgico diferente do programado, sempre em benefício do paciente;
- Que não cabe nenhum tipo de ressarcimento ou indenização caso o animal não responda ao tratamento ou mesmo caso tenha alguma intercorrência decorrente do mesmo;
- Que com tais explicações e esclarecimentos está plenamente satisfeito(a), tendo compreendido e aceitado se submeter ao tratamento de terapia celular proposto;
- Que o responsável pelo Estudo Clínico exposto é a Dra. Patrícia Malard, a qual pode ser contatada pelo e-mail patricia@labbiocell.com;
- Que a BID CELL esta autorizada a divulgar os resultados obtidos, bem como: diagnósticos de imagem, filmes, fotos e/ou outros que a empresa considerar importante.

Outrossim, declaro as especificações do animal de minha propriedade, dato e assino o presente documento, com força de contrato de prestação de serviços médico-veterinários.

Nome:	Sexo:	Idade:
Espécie:	Raça:	
Proprietário:		
Telefone:		
E-Mail:		
R.G:	CPF:	

E para que fique registrado o seu pleno consentimento em se submeter a pesquisa clínica de Terapia com células-tronco mesenquimais, firma o presente documento.

_____, ____ de _____ de _____.

Médico Veterinário Responsável
CRMV:

Proprietário do Animal

