

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

VANESSA SOUZA MÜLLER

**CÉLULAS-TRONCO NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR E NERVOSA**

Porto Alegre

2013/1

VANESSA SOUZA MULLER

**CÉLULAS-TRONCO NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR E NERVOSA**

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção da graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antônio Contesini

Coorientadora: Anelise Bonilla Trindade

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente, aos meus pais, por todo o apoio que me deram na minha vida acadêmica, até hoje, as minhas irmãs que sempre que possível se esforçaram pra me ajudar na conclusão, termino e entrega desse TCC. Ao Pedro, pela sua paciência e seu grande auxílio na tradução e correção do presente trabalho; à Iara que me ajudou na formatação das referências bibliográficas, ao Bruno que deu aquela olhadinha final e fez alterações pontuais excelentes. À minha coorientadora e ao meu orientador, por toda a paciência que eles tiveram no auxílio da elaboração e correção do meu trabalho de conclusão de curso. E, por fim, a todos aqueles que acreditaram que eu conseguisse chegar até aqui.

RESUMO

Muitos estudos têm se desenvolvido a respeito da terapia celular, tanto na medicina humana quanto na veterinária. A transdisciplinaridade permite um avanço simultâneo nas pesquisas, ou seja, as descobertas feitas na medicina humana auxiliam na medicina veterinária e vice-versa. Os resultados das pesquisas variam conforme o tipo de célula-tronco escolhida, método de aplicação e qual doença está sendo estudada. As células-tronco são células indiferenciadas, com grande capacidade de autorrenovação e possuem a habilidade de se diferenciar em, ao menos, um tipo celular específico. As pesquisas com estas células têm ampliado em virtude do seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares, o que leva a crer que elas possuem um potencial terapêutico interessante. As células-tronco adultas são células indiferenciadas no meio de tecidos diferenciados, até a sua especialização e podem ser isoladas de diversos tecidos e órgãos. Dessa forma, o objetivo deste estudo é fazer uma revisão bibliográfica de diversos artigos, livros, trabalhos, etc., com o intuito de reunir os principais resultados acerca das pesquisas em células-tronco. As afecções musculares de escolha foram as seguintes: problemas cardíacos, distrofia muscular, lesões de tendão. Já as afecções neurológicas relatadas foram: lesões na coluna vertebral, isquemia cerebral, síndrome do distúrbio cognitivo, cinomose, epilepsia, Parkinson canino e, por fim, doença do neurônio motor inferior. Por fim, conclui-se que apesar de alguns avanços significativos, existem grandes lacunas teóricas e operacionais sobre sua utilização terapêutica, o que impede seu uso em ampla escala.

Palavras-chave: Células-tronco. Terapia Celular. Afecções musculares. Afecções neurológicas.

ABSTRACT

Many studies have been developed regarding cell therapy, both in human and in veterinary medicine. Transdisciplinarity allows simultaneous progress in research, namely, the progress in human medicine aids the veterinary medicine and vice versa. Research results vary according to the type of stem cell chosen, to the method of application and which disease is being studied. Stem cells are undifferentiated cells with large capacity for self-renewal and have the ability to differentiate into at least one cell type specific. Researches with these cells have expanded due to their potential to differentiate into several cell types, which suggests that they have an interesting therapeutic potential. Adult stem cells are undifferentiated cells in the middle of differentiated tissues until their specialization, it can be isolated from various tissues and organs. Thus, the aim of this study is to review existing literature several articles, books, papers, etc., with the aim of bringing together the main findings about the stem cells research. The chosen muscular disorders were the following: heart disease, muscular dystrophy, tendon injuries. On the other hand, the neurological disorders reported were: spinal injuries, cerebral ischemia syndrome, cognitive disorder, distemper, epilepsy, Parkinson canine, and ultimately, lower motor neuron disease. Finally, it is concluded that in spite of some significant advances, there are large theoretical and operational gaps about their therapeutic use, which prevents their use on a large scale.

Keywords: Stem Cells. Cell Therapy. Muscle Disorders. Neurological Disorders.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	CÉLULAS-TRONCO	9
2.1	Classificação das Células-Tronco quanto a sua Plasticidade	10
2.1.1	Totipotentes.....	10
2.1.2	Pluripotentes.....	11
2.1.3	Multipotentes.....	11
2.1.4	Oligopotentes.....	11
2.1.5	Unipotentes.....	11
2.2	Células-Tronco Embrionárias (CTEs)	12
2.3	Células-Tronco Adultas ou Somáticas	14
2.3.1	Células-Tronco Hematopoiéticas.....	15
2.3.2	Células-Tronco Mesenquimais.....	16
2.4	Células-Tronco Específicas de Alguns Tecidos	18
2.4.1	Células-Tronco Neurais.....	18
2.4.2	Células-Tronco da Pele.....	21
2.4.3	Células-Tronco do Sangue do Cordão Umbilical.....	21
2.4.4	Células-Tronco Cardíacas.....	21
2.4.5	Células Ovais.....	22
2.4.6	Células Satélites.....	22
2.4.7	Pericitos.....	22
3	TERAPIAS CELULARES	24
3.1	Terapia Celular em Problemas Musculares	25
3.1.1	Cardiopatias.....	25
3.1.2	Distrofia Muscular.....	27
3.1.3	Lesão de Tendão.....	28
3.2	Terapia Celular em Doenças Neurológicas	29
3.2.1	Lesões na Coluna Vertebral.....	31
3.2.2	Isquemia Cerebral.....	32
3.2.3	Síndrome do Distúrbio Cognitivo.....	34
3.2.4	Sequela de Cinomose.....	36
3.2.5	Epilepsia.....	37
3.2.6	Parkinson Canino.....	38

3.2.7 Doença do Neurônio Motor Inferior.....	39
4 CONCLUSÃO.....	41
5 REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A terapia celular vem ganhando espaço em estudos de diversas áreas, inclusive na medicina veterinária, onde foram empreendidos grandes avanços nas diversas técnicas de regeneração dos mais variáveis tecidos e órgãos. As células-tronco têm alta capacidade de multiplicação e diferenciação, mesmo após longos períodos de inatividade, o que justifica a atenção que vêm recebendo por parte significativa dos pesquisadores. Apesar de ainda estar em fase de avaliação, estas características sugerem um grande potencial terapêutico para uma ampla gama de doenças. Destarte, as células-tronco acabaram sendo definidas como o milagre da medicina veterinária e a mais recente maravilha da pesquisa biomédica (CAHILL, 2000). Pesquisas vêm avançando no seu uso na clonagem animal, na produção de transgênicos, quimeras e no tratamento regenerativo.

As células-tronco (CTs) são células indiferenciadas, com grande capacidade de autorrenovação e de produção de, pelo menos, um tipo celular altamente especializado (FAGANELLO *et al.*, 2009). As células-tronco têm a capacidade de realizar divisão simétrica e assimétrica, dependendo do seu estágio de multiplicação ou especialização, respectivamente. Podem sofrer a divisão de três formas: autorrenovação simétrica onde a célula mãe dá origem a duas novas células-tronco; autorrenovação assimétrica onde a célula mãe dá origem a uma célula-tronco e uma célula semidiferenciada; ou diferenciação simétrica quando célula mãe dá origem a duas células semidiferenciadas (SILVA, 2012). Sua multiplicação ocorre por mitose, o que faz com que se mantenham indiferenciadas por mais tempo e que a partir de um pequeno número de células se origine uma grande população de células semelhantes.

As células-tronco embrionárias (CTEs) eram consideradas as mais promissoras no início das pesquisas. Hoje, se percebe que em virtude de fatores éticos, possibilidade de rejeição e potencial mutagênico não é o método mais indicado para se trabalhar, ao menos não no momento. A utilização das células-tronco adultas (CTAs) vem sendo trabalhada há algumas décadas, onde o método de eleição mais utilizado era através da coleta de sangue ou da medula óssea, para assim realizar o cultivo das células-tronco hematopoiéticas (CTHs). Contudo, inúmeros estudos têm sido realizados sobre as células-tronco mesenquimais (CTMs), onde estas têm sido consideradas as de maior potencial no tratamento de doenças não hematológicas devido sua melhor facilidade de cultivo.

As células-tronco adultas vêm sendo isoladas dos mais diferentes tecidos, como da polpa dentária, medula óssea, sangue periférico, cérebro, medula espinhal, vasos

sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele, epitélio do sistema digestivo, córnea, retina, fluido amniótico, fígado, pâncreas e células adiposas (COSTA, 2012). Além disso, vem sendo estudado o cultivo celular de células provenientes da mucosa olfatória de cães, com o propósito de tratar de lesões traumáticas e nervosas degenerativas (ALVES *et al.*, 2010).

Tendo isso em perspectiva, este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre as células-tronco em geral, dando ênfase na terapia celular para os tratamentos de problemas neurológicos e musculares dos animais e, em alguns casos, dos humanos.

2 CÉLULAS-TRONCO

A terapia celular busca restaurar o funcionamento de tecidos e órgãos através da proteção da integridade celular ou reposição de células danificadas por células saudáveis, regenerando e reparando o tecido lesionado. Ela vem ganhando mais atenção nos últimos tempos e tem sido tratada com otimismo, muitas vezes, exagerado pelos pesquisadores e meios de comunicação. Surge, assim, como a possibilidade de terapia de enfermidades diversas de difícil manejo na clínica, como síndrome do distúrbio cognitivo, isquemia cerebral, epilepsia, enfermidades hepáticas, *diabetes mellitus*, cardiomiopatias, distrofias musculares; além de uma série de lesões agudas, como queimaduras, lesões ortopédicas, lesões na medula espinhal, acidentes vasculares cerebrais e infarto do miocárdio (PINCOLINI; CAÑEDO, 2010; BELTRAMI *et al.*, 2003; DELL'AGNOLA *et al.*, 2004).

Desde o início do século XX, já se sabia da existência das células-tronco nos tecidos dos organismos adultos (LARGEAULT, 2004). Em 1945, se iniciou estudos com camundongos, onde estes recebiam doses letais de radiação e, por volta de 1956, foi visto que alguns destes grupos mostraram que o transplante de medula óssea protegia esses animais contra o efeito da radiação (TILL; MCCULLOCH, 1961). Nos anos 70, foram descritos os primeiros estudos em camundongos a respeito destas células, até que, em 1998, as células-tronco foram isoladas do homem pelos pesquisadores James Thomson e John Gearhart, nos EUA.

A pesquisa a respeito deste tipo celular tende a se ampliar cada vez mais, levando em consideração a série de variáveis que as englobam como fonte, número e seleção prévia das células-tronco, assim como os mecanismos envolvidos, os cenários clínicos ideais e as complicações a longo prazo ocorrer decorrentes de seu uso (OKAMOTO; CAMPOS, 2004). A maioria das células do organismo tem sua renovação a partir de células-tronco presentes nos diferentes tecidos (NARDI, 2007). Estas são células indiferenciadas, autorrenováveis e com alta capacidade de proliferação, podendo assim, originar células diferenciadas e funcionais, o que faz delas muito promissoras para o tratamento de tecidos e órgãos lesionados.

As células-tronco têm capacidade de realizar divisão simétrica e assimétrica, dependendo do seu estágio de multiplicação ou especialização, respectivamente. Podem sofrer a divisão de três formas: autorrenovação simétrica (célula mãe dá origem a duas novas células-tronco), autorrenovação assimétrica (célula mãe dá origem a uma célula-tronco e uma célula semidiferenciada) ou diferenciação simétrica (célula mãe dá origem a duas células

semidiferenciadas) conforme a necessidade de diferenciação (SILVA, 2012). Geralmente, elas se dividem de forma assimétrica, pelo mecanismo de mitose, formando duas células-filhas idênticas entre si e sua progenitora. Estas células, quando submetidas a estímulo adequado podem se diferenciar, originando um ou mais tipos de células especializadas (NARDI, 2007). O processo de diferenciação é regulado pela expressão preferencial de genes específicos nas células-tronco, porém, ainda hoje, não está bem esclarecido. Certamente depende do microambiente em que a célula está inserida, ou seja, pela influência exercida pelas células vizinhas, e pela presença (ou ausência) dos variados fatores de diferenciação (CÉLULAS-TRONCO, 2009).

As CTs são classificadas conforme sua capacidade de especialização - plasticidade - em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes. Ou ainda quanto a sua natureza em células-tronco embrionárias e adultas (EVANS; KAUFMAN, 1981). As CT adultas são divididas em células-tronco hematopoiéticas, mesenquimais, neurais, da pele, do cordão umbilical, entre outras (GRINFELD, GOMES, 2004). As mais estudadas atualmente são as hematopoiéticas e as mesenquimais, aonde a segunda vem ganhando maior espaço nos trabalhos científicos. Ela pode ser extraída das mais diversas fontes, como medula óssea e espinhal, vasos sanguíneos, cordão umbilical, músculo esquelético, células adiposas, entre outros. Existem marcadores celulares que conseguem distinguir com qual tipo celular que se está trabalhando através da expressão ou não, de antígenos específicos, como por exemplo, CD29, CD34, CD14, CD45, CD44, CD90, CD105, CD133, CD106 (OKAMOTO; CAMPOS, 2004).

As células-tronco espermatogoniais surgem como uma nova tecnologia de reprodução assistida para a preservação de espécies animais com risco de extinção, assim como na criação de animais transgênicos para a produção de produtos farmacêuticos ou para o uso de modelos biomédicos (FORTIER; TRAVIS, 2011).

2.1 Classificação das Células-Tronco quanto a sua Plasticidade

2.1.1 Totipotentes

As células-tronco totipotentes podem originar um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico (GAGE, 2000). Além disso, têm a capacidade de se diferenciar nas células do folheto extraembrionário que dão sustentação ao embrião no útero materno, incluindo

placenta e membranas embrionárias. Isoladas do oócito fertilizado (zigoto) e dos embriões até o estágio de mórula (FRITSCH *et al.*, 2007).

2.1.2 Pluripotentes

Semelhantes às células totipotentes, porém um pouco mais especializadas, capazes de se diferenciarem em todas as células dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma), exceto placenta e nos anexos embrionários (COSTA, 2012). Ou seja, podem originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar os tecidos de apoio ao feto (SOUZA *et al.*, 2003).

São células-tronco embrionárias, obtidas da massa celular interna do blastocisto, a partir dos quatro dias de vida. Podem também ser isoladas das células germinativas e, até mesmo de teratocarcinomas (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007).

2.1.3 Multipotentes

São células pouco mais diferenciadas, podendo ser extraídas do indivíduo adulto. Obtidas a partir de fontes diversas, como tecido fetal, células germinativas embrionárias, cordão umbilical ou mesmo de tecidos adultos diferenciados, sobre os quais encontramos uma gama de estudos sobre os diferentes locais de coleta destas células (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001).

As células-tronco multipotentes são mais limitadas que as anteriores quanto ao seu poder de diferenciação, elas também se diferenciam em vários tipos de células, mas de um mesmo folheto embrionário (FRANCA; VICENTE; CHAN, 2011).

2.1.4 Oligopotentes

São células-tronco com poder de diferenciação mais restrito, capazes de formar células de um mesmo folheto embrionário e se diferenciar em poucos tecidos. Encontra-se em tecidos já diferenciados, como no tecido intestinal (ZAGO, 2006).

2.1.5 Unipotentes

São células que se diferenciam em um único tipo celular de um mesmo folheto embrionário. Ou seja, transformam-se em um único tecido, entretanto garantem a reposição e renovação celular (FRITSCH *et al.*, 2007). Como exemplo, podemos citar as células espermatogênicas, que são responsáveis pela produção contínua de espermatozoides (MCLAREN, 2000).

2.2 Células-Tronco Embrionárias (CTEs)

São células totipotentes e pluripotentes, dependendo da fase onde são coletadas. As células-tronco totipotentes são encontradas no oócito fertilizado (zigoto) e nos embriões até o estágio de mórula (FRITSCH *et al.*, 2007). Mas, comumente, as células-tronco embrionárias são obtidas nos estágios iniciais da fecundação, coletadas a partir de quatro ou cinco dias após a fecundação, quando se forma o blastocisto¹ (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007). São coletadas da massa interna do blastocisto, geralmente, no 7º dia (NARDI; BRAGA; CAMASSOLA, 2013). Estas células possuem caráter pluripotente, sendo capazes de originar um ser completo, se diferenciam formando as três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) as quais darão origem a todos os tipos celulares, exceto placenta e anexos embrionários (COSTA, 2012). Durante o desenvolvimento, estas camadas participam da organogênese e da formação dos tecidos (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007). Acredita-se que as células-tronco específicas de cada tecido auxiliem na orientação da diferenciação dos mesmos. Elas possuem capacidade prolongada de proliferação indiferenciada (divisão simétrica) e potencial de desenvolvimento de células das três camadas germinativas, mesmo após longos períodos em cultivo (THOMSON *et al.*, 1998).

Ainda não há protocolos clínicos que utilizem as células-tronco embrionárias com fins terapêuticos, dada sua grande capacidade mutagênica. O que pode representar uma insegurança no seu uso, podendo acarretar em teratomas (CIRNE-LIMA, 2007) ou teratocarcinomas, devido sua pluripotencialidade. Elas apresentam grande potencial terapêutico, mas para isso devem ser desenvolvidos mais estudos quanto à sua biologia celular e molecular antes de sua utilização clínica, para que, uma vez aplicadas em determinado tecido ou órgão se diferencie apenas nas células que se espera. Na década de 60, Leroy Stevens e Barry Pierce descreveram células pluripotentes provenientes de teratomas, capazes de se diferenciar nos três folhetos embrionários (SOLTER, 2006). Martin Evans e Matthew

¹ O blastocisto é composto pelo trofoblasto e pelas células da massa interna.

Kauffman, nos anos 80, foram os pioneiros no isolamento das células pluripotentes a partir dos blastocistos de camundongos. Experimentos com injeção de CTEs em camundongos imunodeficientes SCID (do inglês, *Severe Combined ImunoDefficient*) causaram um processo indiferenciado de proliferação, onde houve a formação de teratomas compostos provenientes dos três folhetos embrionários e ainda, a formação de quimeras (REHEN; PEREIRA; MUOTRI, 2007).

A capacidade de pluripotência destas células pode ser prolongada *in vitro* na presença de uma camada de fibroblastos fetais mitoticamente inativados e na presença de fator inibidor de leucemia (LIF, do inglês, *Leukemia Inhibiting Factor*). Isso devido à ativação de fatores que controlam a expressão de genes responsáveis pela manutenção do estado indiferenciado das CTs pela LIF. Em geral, a diferenciação *in vitro* destas células deve ocorrer no cultivo em suspensão na ausência de LIF (REHEN; PEREIRA; MUOTRI, 2007).

O primeiro marcador imunocitoquímico utilizado para a caracterização de CTEs foi a fosfatase alcalina, além da expressão de fatores como Oct-4, Nanog, Sox-2. Além destes, alguns fatores como o SSEA-1 (*Stage-specific embryonic antigen-1*) e antígenos de superfícies característicos de células de carcinoma embrionário também são reconhecidos.

Expectativas são geradas quanto a utilização das CTES na aplicação de pesquisas básicas, na regeneração tecidual e na área de reprodução e clonagem (FORTIER; TRAVIS, 2011). No entanto, a falta de conhecimentos básicos sobre seu mecanismo de diferenciação, a possibilidade de formação de tumores *in vivo* e a ocorrência de instabilidades cromossômicas e a histocompatibilidade são fatores que requerem atenção e mais estudos, o que impede atualmente sua utilização com fins terapêuticos. Além disso, a questão ética quanto a sua obtenção causa grande repercussão e acarreta o retardo no avanço dos estudos com as células embrionárias.

Alguns países da Comunidade Europeia, Canadá, Austrália, Japão, China, Coréia do Sul e Israel aprovaram pesquisas com células-tronco embrionárias derivadas do embrião há pouco tempo (GRINFELD; GOMES, 2004). Dos países que integram a União Europeia, a Inglaterra foi pioneira em autorizar sua utilização nas pesquisas, nos anos 2000. Nos EUA, a *Food and Drougs Administration* (FDA) foi a responsável por autorizar o uso de CTEs humanas em ensaios para o tratamento de lesão espinhal torácica em humanos, em 2010 (COSTA, 2012).

No Brasil, em 2005, foi aprovada a Lei de Biossegurança, a qual regulamenta o uso das CTEs humanas para fins de pesquisa. Porém sua obtenção é restrita aos embriões congelados há mais de três anos, que seriam utilizados para fertilização *in vitro*, ou embriões

inviáveis com consentimento dos progenitores em ambos os casos (BRASIL, 2005). Entretanto, isso pode comprometer sua utilização, embora Braga (2007) afirme que após virar blastocisto não importa a qualidade do embrião, ambas teriam a mesma capacidade de estabelecer linhagens de células-tronco embrionárias.

Contudo, elas são fontes promissoras para a terapia celular e para a obtenção de materiais para transplante. Além das células-tronco embrionárias, há a investigação do potencial terapêutico das células-tronco coletadas de tecidos fetais abortados ou perinatais (placenta e líquido amniótico) e do sangue do cordão umbilical, sendo estes tanto para sua utilização alogênica ou autóloga (SOARES, 2007).

2.3 Células-Tronco Adultas ou Somáticas

As células-tronco adultas (CTAs), também chamadas de células-tronco somáticas, têm capacidade de autorrenovação e deve ser clonogênica. Sua função é manter as células que vão morrendo no organismo ao longo dos anos e reparar e manter a integridade de órgãos e tecidos. Isso ocorre através de um mecanismo, onde receptores de superfície avisam as células sobre a lesão do órgão ou tecido havendo a migração destas CTs para a regeneração das áreas afetadas. A função primordial das CTAs é manter a homeostase do tecido, substituindo as células que morrem no decorrer da vida (WALSH; ANDREWS, 2003). Estas células são indiferenciadas no meio de tecidos diferenciados, até a sua especialização nos processos de crescimento, renovação celular, reparo tecidual e diferenciação tecidual. Como exemplo podemos citar a regeneração da pele após um corte, a recuperação do fígado após a perda da massa, as células sanguíneas que estão em constante renovação, o tecido endometrial que sofre alterações a cada ciclo menstrual e gestação, entre outros.

As CTAs são vantajosas se comparadas com as embrionárias, primeiramente pela questão ética de obtenção, além de sua maior facilidade de isolamento, possibilidade de obtenção a partir de diversas fontes, menor imunogenicidade e, possivelmente, menor formação de teratomas (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Atualmente, foram encontradas CTs em, quase todos, os tecidos. Já foram identificadas na medula óssea, pele, rim, córnea, retina, fígado, baço, tecido adiposo, trato gastrointestinal, pâncreas, músculo esquelético, vasos sanguíneos, sangue periférico, fluido amniótico, polpa dental, até mesmo no coração e no cérebro, onde se acreditava que não ocorresse processo de regeneração, além de diversos outros órgãos (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006). Ainda podem ser isoladas do embrião em desenvolvimento (SANCHEZ-RAMOS, 2002). As CT provenientes da polpa

dentária são uma fonte minimamente invasiva, devido à utilização de materiais de descarte provenientes de procedimentos ortodônticos (YAO; NORTON; WISE, 2004). Além disso, há relatos de que elas podem ser utilizadas como neuroprotetor para as CTMs e como modelo para o entendimento de dois processos: gênese de células adiposas, nervosa, dentárias e ósseas, além da inter-relação das CTMs com neurônios em muitas doenças degenerativas, onde a neurotoxicidade é um evento patológico determinante (YALVAÇ *et al.* 2009).

As células-tronco adultas se dividem assimetricamente, onde uma CTA origina duas células filha, sendo uma célula idêntica à mãe e a outra progenitora, a qual dará origem a uma célula madura diferenciada. São raras no organismo adulto, onde se estima que haja apenas uma célula tronco hematopoiética a cada dez mil células da medula óssea (WAISSMAN, 2000). Assim sendo, há certa dificuldade na sua identificação, isolamento e purificação, além de não serem capazes de proliferar indiferenciadamente por longos períodos *in vitro*, o que dificulta a sua utilização. Contudo, são importantes nas terapias celulares, devido seu potencial de regeneração de órgãos e de tecidos lesados, através da obtenção de tecidos autólogos. É possível que a utilização de CTAs alogênicas seja possível, entretanto, as células obtidas não podem ser utilizadas prontamente, devendo ser expandidas *in vitro* antes de seu uso. Contudo, há a possibilidade de rejeição e eliminação destas pelo sistema imune do paciente. Uma das vantagens da terapia com células-tronco adultas é a possibilidade de sua utilização autóloga, evitando assim que ocorra a rejeição imunológica no seu transplante (SOARES; SANTOS, 2002).

Anteriormente, pensava-se que estas originavam apenas células do mesmo tecido de coleta, mas com o avanço das pesquisas isso vem sendo desmistificado. Já foram localizadas células-tronco viáveis no cérebro de cadáveres (PALMER *et al.*, 2001), o que reforça a ideia de obtenção de células-tronco em fontes não acessíveis, para o uso autólogo, caso haja demonstração de sua eficácia (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007). Na medula óssea podemos encontrar duas populações distintas de células-tronco, as quais coexistem de maneira funcionalmente interdependente, as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e as células-tronco do estroma da medula óssea, sendo estas as mais utilizadas nas terapias celulares. As CTAs, principalmente as células-tronco derivadas da medula óssea (CTMO), são consideradas seguras nas terapias celulares, devido seu baixo risco em transformações malignas e sua ampla capacidade de diferenciação. Contudo, sua habilidade imunossupressora pode causar, indiretamente, o crescimento tumoral e proliferação metastática (ASANUMA, MELDRUM, MELDRUM, 2010).

As CTHs são as responsáveis por toda a linhagem hematopoiética, dando origem aos progenitores mieloides e linfoides e, conseqüentemente, a linfócitos, neutrófilos, basófilos, hemácias, plaquetas e demais células sanguíneas. Já as do estroma são capazes de formar condroblastos, osteoblastos, células endoteliais e adipócitos (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007).

As células-tronco adultas geram tipos celulares pré-diferenciados que possuem morfologias e funções especializadas (FRITSCH *et al.*, 2007), denominadas células progenitoras ou precursoras, são consideradas comprometidas a formar uma determinada linhagem celular. Porém, alguns estudos contradizem, mostrando a teoria da transdiferenciação (D'AMATI G *et al.*, 2000). Ainda hoje não se sabe ao certo se a hipótese de transdiferenciação *in vivo* está correta ou não. Há trabalhos sobre regeneração hepática que demonstraram que o que parecia ser transdiferenciação de uma célula hematopoiética, era no fim a sua fusão com o hepatócito, contestando assim esta hipótese (EMERICK; MONTENEGRO; DEGRAVE, 2007). Isso faz com que os mecanismos da regeneração com células-tronco não sejam bem definidos, mas mesmo assim acredita-se que elas recuperem, parcialmente ou totalmente, os órgãos lesados, talvez pelo efeito parácrino de secreção de alguns fatores, como citocinas, fatores do crescimento, antiapoptóticos, entre outros, pelas células injetadas (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007). Alguns trabalhos demonstraram o seu potencial de transdiferenciação, *in vitro* e *in vivo*, em vários tipos celulares, levando em conta a própria formação de teratoma no adulto, o que indica certa pluripotencialidade destas células-tronco, semelhantes às embrionárias.

Ainda não está bem elucidada a forma com que ocorre a melhoria funcional pela terapia celular. Acredita-se que talvez seja pela liberação de mediadores na área da lesão, ou mesmo, em alguns casos, pela neovascularização reduzindo o número de destruição celular e apoptose e aumentando a irrigação destas áreas. As células-tronco mesenquimais secretam inúmeros mediadores, tais como citocinas e fatores de crescimento, o que pode acarretar na imunossupressão (MONTEIRO; NETO; CARLO, 2010).

Hauger (2006) observou em seu estudo, um modelo de lesão glomerular em ratos, injetando células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea por via intravenosa e fez o acompanhamento através de ressonância magnética nuclear, onde constatou a migração destas células, marcadas com partículas magnéticas, para as áreas lesadas do rim. Estudos relatam esta migração também em algumas doenças neurológicas e cardiopatias não isquêmicas (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007). O fator derivado de célula estromal-1 (SDF-1) e fator de crescimento de hepatócitos possuem ação de recrutamento dessas células pra área da lesão

após o sinal de dano (KUCIA *et al.*, 2004). Observou-se o aumento do número de células-tronco mesenquimais no sangue periférico após algumas situações de lesão vascular cerebral (KUCIA *et al.*, 2006) e de infarto agudo do miocárdio (WOJAKOWSKI, 2006).

As células-tronco adultas se dividem conforme sua fonte origem, podendo ser hematopoiéticas e mesenquimais, as quais serão descritas a seguir.

2.3.1 Células-Tronco Hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) são, provavelmente, a população de células-tronco melhor caracterizada dentre as demais, por serem as primeiras a serem descobertas, em meados dos anos 60, por Till e McCulloch. Porém, só em 1986, foram isoladas com a utilização de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície (MULLER-SIEBURG; WHITLOCK; WEISSMAN, 1986). Elas estão em constante multiplicação e formam as demais células da linhagem hematopoiética, sendo responsáveis pela reposição de células maduras no sangue. Em um indivíduo normal, os níveis das células maduras no sangue são mantidos em limites estreitos e, em resposta a emergências, como perda sanguínea ou infecções, os tecidos hematopoiéticos são capazes de responder rapidamente a estímulos, aumentando a produção celular (TRINDADE *et al.*, 2013).

As CTHs são, rotineiramente, utilizadas na medicina humana em transplantes oncológicos, de problemas hematológicos e doenças autoimunes (WEISSMAN, 2000), sendo assim mais bem estudadas que as demais células-tronco. Entretanto, seu poder de diferenciação nos demais tipos celulares hematopoiéticos e não hematopoiéticos ainda não está bem elucidado. Podem ser isoladas a partir da medula óssea, sangue periférico e sangue do cordão umbilical (FRITSCH *et al.*, 2007). A sua coleta é feita, geralmente, da medula óssea, porém estudos relatam que neste local há mais de um tipo celular, podendo ser visto células progenitoras endoteliais células-tronco mesenquimais e suas subpopulações, as quais podem ser confundidas com CTHs. São isoladas a partir da citometria de fluxo ou de microesferas magnéticas com base na expressão de seus marcadores ou com o uso de anticorpos monoclonais contra eles (PAZ; LUGO, 2007).

As CTHs expressam, geralmente, o marcador de superfície CD34⁺, sendo este o mais utilizado da sua diferenciação. Também se utiliza a expressão de enzimas intranucleares, como aldeído-dehidrogenase, devido a expressão de CD34 variar conforme o estado de ativação da CT (CAI; WEISS; RAO, 2004). *In vitro* são diferenciadas através de ensaios

clonogênicos, os quais garante linhagens de CTHs com pureza de 85 a 95%, ajudando a estabelecer número, tipos e atividades funcionais destas células (PAZ; LUGO, 2007).

2.3.2 Células-Tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram, primeiramente, descritas durante a investigação das células pertencentes ao estroma da medula óssea (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Há a contestação sobre sua nomenclatura, devido o mesenquima ser o tecido não diferenciado do embrião, com isso, foram surgindo outras denominações como células-tronco estromais, células progenitoras mesodérmicas (SETHE; SCUTT; STOLZING, 2006), células-tronco mesenquimais maduras, precursores de tecidos não hematopoiéticos, unidades formadoras de colônias de fibroblastos, células medulares estromais, células progenitoras multipotentes adultas, células-tronco reciclantes RS-1 e RS-2 e células-tronco multipotentes da medula óssea humana (FRITSCH *et al.*, 2007). Com isso, a Sociedade Internacional de Terapia Células determina a padronização da nomenclatura em células estromais mesenquimais multipotentes, do inglês *multipotent mesenchymal stromal cell* (HORWITZ *et al.*, 2005).

As CTMs são multipotentes e dão origem a vários tecidos conectivos. São encontradas no estroma de diversos locais, como medula óssea, polpa dentária, tendão, tecido adiposo, do sangue do cordão umbilical, fluido amniótico, placenta, membrana sinovial, músculo esquelético e diversos outros tecidos e órgãos (GADE *et al.*, 2012). Não foram identificadas CTMs no sangue periférico, o que se acredita ser em virtude da localização em nicho perivascular (MEIRELES, CHAGASTELLES; NARDI, 2006). São células aderentes às placas de cultivo e com forma fusiformes. Elas proliferam e podem se diferenciar em diversos tipos celulares, como osteoblastos, condroblastos, adipócitos (BIANCO *et al.*, 2001), fibroblastos (GADE *et al.*, 2012), tenócitos e miócitos (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001). São isoladas e cultivadas facilmente, além de possuírem uma taxa de expansão elevada em *ex vivo*.

Elas são excelentes candidatas a utilização de terapias celulares, devido à sua facilidade de obtenção, a partir da medula óssea (crista ilíaca superior, tíbia, do fêmur, do úmero e da coluna vertebral, lombar e torácica e tecido adiposo, e pela sua rápida capacidade de expansão *in vitro* mantendo suas características, assim como por suas propriedades biológicas. A vantagem das CTs do tecido adiposo, em comparação com as células-tronco

derivadas da medula óssea, é o método fácil de obtenção da fonte tecidual (YARAK, OKAMOTO, 2010).

As CTMs constituem uma pequena população celular na medula óssea, correspondendo a uma faixa de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. Contudo, podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas (TRINDADE *et al.*, 2013). Estudos demonstraram sua capacidade em se diferenciar em diversos tipos celulares, incluindo neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos, células do músculo liso e esquelético (YARAK; OKAMOTO, 2010).

Acreditava-se que as CTMs fossem todas semelhantes, entretanto estudos demonstram algumas propriedades diferentes entre elas (KERN *et al.*, 2006). Com isso, podemos acreditar que cada uma delas teria uma função terapêutica distinta. Estas células tem a expressão aumentada de proteínas transportadoras da família ABC (*ATP binding cassette*) o que permite sua marcação com corante Hoechst 33258. Este corante é expulso de dentro das células pela ação das proteínas transportadoras e, por isso, foram denominadas de “*side population*” na análise por citometria de fluxo (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007). Elas possuem expressão positiva para CD105, CD73 e CD90 e são negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD 11b, CD79a, ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006).

No estudo de Johnson *et al.* (2005), foi demonstrado que as CTMs tinham capacidade de formar células de linhagem germinativa, ou seja, ovócitos. Além disso, algumas pesquisas demonstraram a capacidade imunossupressora destas células, onde houve a inibição da proliferação de linfócitos ativados por estimulação com antígeno mitogênico e reações mistas linfocitárias foram observadas *in vitro* (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007); o que pode auxiliar na sua capacidade terapêutica em transplantes alogênicos, pela sua habilidade de modulação das respostas imunoinflamatórias. As CTMs da medula óssea expressam um amplo espectro de citocinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente na manutenção do ambiente estromal, que é importante elemento regulador da hematopoiese e de outros sistemas celulares presentes na medula óssea. Também, produzem uma série de moléculas da matriz extracelular, incluindo a fibronectina, laminina, colágenos e proteoglicanos (COVAS, 2006).

Ainda há muito a ser descoberto sobre estas células, mas elas se tornam grande esperança para a terapia celular no reparo de lesões teciduais, tratamento de doenças genéticas e degenerativas e, quem sabe, no tratamento de doenças neoplásicas.

2.4. Células-Tronco Específicas de Alguns Tecidos

2.4.1 Células-Tronco Neurais

Acreditava-se, antigamente, que o sistema nervoso não se regenerava, sendo incapaz de renovar os neurônios, ou seja, a neurogênese ocorria apenas nos estágios embrionários iniciais. Isto é, o indivíduo nascia com uma determinada quantidade de neurônios e conforme ocorresse a morte celular, este número decrescia sem possibilidade de substituição. Hoje, estudos demonstraram que existem células-tronco neurais no cérebro e na medula espinhal que são responsáveis pela capacidade de regeneração do tecido nervoso (GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002). Estas células foram isoladas de diferentes regiões do cérebro, onde proliferam, mantendo assim sua população, e geram células progenitoras que se diferenciam em células neuronais (GAGE, 2002).

As principais classes de células do sistema nervoso central são as células nervosas - neurônios - e as células gliais - macroglia e microglia - (COSTA, 2012). As células precursoras da glia formam os oligodendrócitos e astrócitos, os quais são responsáveis pela produção de mielina e sustentação mecânica e metabólica, respectivamente. As células endoteliais, que revestem a superfície luminal da parede ventricular adulto, ou os astrócitos, que residem na zona subventricular adjacente (células do tipo B) têm sido sugeridas como uma fonte de células-tronco neurais adultas multipotentes (GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002). Estas células são estimuladas a proliferar em resposta a fatores mitogênicos, como fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), fator de crescimento epidérmico (EGF), e têm a capacidade de originar neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e uma variedade de células sanguíneas (SOUZA *et al.*, 2003)

A sua obtenção ainda é inviável, devido à necessidade de método invasivo e traumático da coleta, podendo ser obtidas a partir de cirurgias cerebrais (RICE, HALFPENNY; SCOLDING, 2003). Atualmente, a melhor forma de obtenção das CTNs é através de biópsia do bulbo olfatório (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007), sendo pouco invasiva, se comparado com as cirurgias cerebrais. Através destas, podemos obter culturas de células progenitoras proliferativas capazes de formar neuroesferas, as quais são estruturas não aderentes com capacidade proliferativa e formato esférico, constituídas de células-tronco neurais e células diferenciadas, associadas por elementos de matriz extracelular (CAMPOS, 2004). Trabalhos mostram a possibilidade de obtenção das CTNs em cérebros de animais *post-mortem*, mas resta saber se estas teriam utilidade terapêutica ou não (PALMER *et al.*, 2001). Clarke *et al.* (2000), em seu estudo demonstrou que as células-tronco neurais possuem

capacidade de originar células de todas as camadas germinativas, porém sua pluripotencialidade ainda é controversa.

As CTNs expressam proteínas como a nestina, proteína ácida glial fibrilar (GFAP), NeuN e MAP-2, assim como alguns marcadores de superfície (COSTA, 2012).

2.4.2 Células-Tronco da Pele

A pele, como já é sabido, tem grande poder de regeneração e reparo constante, o que é extremamente fundamental para a integridade e homeostase do organismo, visto que é o maior órgão do corpo. Foram encontradas células-tronco com diferentes propriedades (SHI *et al.*, 2006) nas diferentes camadas da pele, tanto na derme quanto na epiderme. As da epiderme se localizam na lâmina basal e têm potencial restrito de renovação e reparo do epitélio. As da derme, são heterogêneas e possuem capacidade de gerar outros tipos celulares da pele, do folículo piloso e da glândula sebácea, além de poder se diferenciar em neurônios, células endoteliais, hematopoiéticas e do músculo liso, entre outras (SHI *et al.*, 2006).

A sua utilização na terapia celular vem sendo aplicada mais no reparo tecidual, em alguns casos. Alguns estudos demonstraram a redução da formação de cicatrizes nos locais de aplicação (SATO *et al.*, 2004).

2.4.3 Células-Tronco do Sangue do Cordão Umbilical

O sangue do cordão umbilical (SCU) surgiu como fonte alternativa rica em células-tronco hematopoiéticas e tem como vantagem o baixo risco para o doador, a fácil coleta e a utilização de material que, usualmente, seria descartado.

A histocompatibilidade destas células com doadores irmãos idênticos, se comparadas as da medula óssea, tem menor rejeição. Além das CTH, o SCU contém células-tronco hematopoiéticas e progenitoras endoteliais. Alguns estudos demonstraram a obtenção de células mesenquimais a partir do cordão umbilical, porém ainda são controversos devido expressão de marcadores diferentes (OKAMOTO; CAMPOS, 2004). Hoje se estuda a criação de bancos de sangue de cordão umbilical para uso autólogo e alogênico, o que já existe em países como EUA e alguns da União Europeia.

2.4.4 Células-Tronco Cardíacas

Populações celulares com características de células-tronco já foram isoladas do miocárdio, demonstrando que este possui potencial de reparação. Estudos demonstram uma mistura de populações celulares com características de células-tronco no coração (LERI; KAJSTURA; ANVERSA, 2005). Há indícios de que estas células sejam as mais indicadas nos tratamentos de lesões cardíacas, porém mais estudos devem ser realizados para demonstrar sua eficácia e segurança no transplante heterólogo e autólogo.

2.4.5 Células Ovais

Células não parenquimatosas que se localizam na região periportal do fígado, em baixa quantidade. Acredita-se que tenham função na regeneração do tecido hepático, onde há a maior proliferação destas através de estímulos patológicos. Ainda há contradição quanto sua origem, onde alguns autores afirmam ser originadas na medula óssea (PETERSEN *et al.*, 1999), outros alegaram ser originadas no fígado (WANG *et al.*, 2003). Estudos vêm sendo realizados quanto a sua utilização terapêutica em problemas hepáticos e até mesmo seu uso na *diabetes mellitus*, devido a capacidade de se diferenciar em tecido pancreático endócrino secretor de insulina.

2.4.6 Células Satélites

As células satélites (CSs) estão presentes nos músculos dos mamíferos, onde sua taxa de proliferação é baixa, porém durante os processos de regeneração e crescimento muscular elas adquirem uma maior capacidade proliferativa. As CSs originam as células precursoras dos músculos (mioblastos), que geram novas fibras musculares as quais, posteriormente, se fusionarão com as já existentes (COLLINS *et al.*, 2005).

São consideradas as células-tronco específicas do tecido muscular por sua capacidade de diferenciação e autorrenovação. Ainda acredita-se que elas possuem potencial neurogênico, osteogênico e adipogênico (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007).

2.4.7 Pericitos

São células que circundam os vasos sanguíneos de pequeno calibre, tem origem mesodérmica e tem formato alongado. Estudos demonstram que elas podem proliferar e diferenciar em outros tipos celulares, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos

e células do músculo liso, o que indica um potencial de células-tronco, sob determinadas condições (DOJERTY; CANFIELDS, 1999). Acredita-se que sejam da mesma população celular que as células-tronco mesenquimais, devido a semelhança na resposta a fatores celulares, a expressão de marcadores e de sua capacidade de diferenciação (BIANCO *et al.*, 2001).

3 TERAPIAS CELULARES

A terapia celular é um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências, que visa a transferência de células com fins terapêuticos de diversas doenças. É realizada através da inoculação de células em determinado indivíduo, com a expectativa de que estas proliferem, se diferenciem ou secretem fatores que promovam a regeneração dos tecidos lesionados (TRINDADE *et al.*, 2013). Quando realizada, produz uma série de fatores que podem ser pró ou contra o processo. Ela oferece a possibilidade de tratamento para uma diversas doenças hereditárias ou adquiridas que antes pareciam intratáveis, como algumas doenças neurológicas, metabólicas, cardíacas e até mesmo o câncer. Para isso, estudos vêm avançando quanto ao potencial terapêutico das células-tronco, seja em matéria de qual a melhor forma de coleta, seja acerca da melhor via de administração.

Há décadas, a terapia com células-tronco coletadas da medula óssea vem sendo utilizada na rotina médica humana, no tratamento de diversas doenças hematológicas e do sistema imune. Na medicina veterinária esses tratamentos têm sido utilizados, mesmo sem comprovação científica dos benefícios, em tratamento de lesões na coluna vertebral, tendinite, defeitos da cartilagem, artrose e ligamentos, doenças hepáticas, feridas, defeitos cardíacos e lesões ósseas nos animais (GADE *et al.*, 2012).

Devido ao aumento da expectativa de vida dos animais de companhia, há um aumento do número de problemas crônico-degenerativos. Assim sendo, as terapias celulares estão ganhando mais atenção para o tratamento de diversas doenças, como uma alternativa para a sua interrupção ou mesmo cura das que, até o presente momento, não possuem tratamento efetivo. O uso terapêutico das CTs ainda é questionado pela falta de protocolos, tanto sobre a melhor forma de isolamento, quanto às vias (intravenoso, intralesional, ao redor da lesão) e doses de administração para cada problema. Sabe-se que as CTs possuem a capacidade de migrar até os órgãos e tecidos lesionados e, além disso, elas possuem fortes propriedades imunossupressoras (Le BLANC; PITTENGER, 2005).

A caracterização das células deve ser seguida dos critérios exigidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular antes da sua utilização terapêutica (DOMINICI *et al.*, 2006). Pesquisas demonstraram a ação parácrina das células-tronco, onde se supõe que a secreção de citocinas seja o mecanismo responsável pelo seu potencial regenerativo, sendo esta a ação benéfica na terapia celular (BURDON *et al.*, 2011). Essa ação influenciaria as

células adjacentes aumentando a sobrevivência celular e ativando mecanismos endógenos de reparo e regeneração (GNECCHI *et al.*, 2008).

Ainda não está claro se as células-tronco, primeiramente, se diferenciam em tecido celular específico ou se elas primeiramente ajudam na reparação do tecido através da secreção de imunomoduladores e fatores tróficos bioativos, ou ainda, se é uma combinação dos dois mecanismos (FORTIER; TRAVIS, 2011).

Os transplantes podem ser de diferentes fontes, classificando-se como autólogo (mesmo animal), alogênico (outro animal da mesma espécie), ou ainda, xenogênico (animal de espécie diferente), de acordo com a espécie que doará as células-tronco. Seu uso terapêutico tem sido indicado em diversos tipos de lesões ortopédicas, doenças cardíacas, metabólicas, neurológicas e muitas outras (MORALES, 2007).

A *diabetes mellitus* é uma das doenças alvo da terapia celular, onde há a redução da produção de insulina pelas células b das ilhotas de *Langerhans* do pâncreas. Estudos mostraram que os sintomas foram eliminados e o nível de glicose na circulação sanguínea voltou ao normal (JUN; YOON, 2005).

A maior limitação da terapia celular é a baixa eficácia terapêutica de células transdiferenciadas no local da lesão. Essa limitação tem sido atribuída ao estresse celular, ambiente hostil devido a inflamação e hipóxia, suprimento sanguíneo insuficiente e elaboração de citocinas inflamatórias, resultando em isquemia e morte celular (COSTA, 2012).

Um dos grandes desafios dos pesquisadores que trabalham com terapia celular é poder realizar a substituição de próteses e medicações de uso contínuo por tecidos e órgãos vivos em animais deficientes. Algumas empresas especializadas já realizaram tratamentos com células-tronco e afirmam obter, na maioria dos casos, respostas positivas no tratamento de certas lesões, como na ortopedia.

3.1 Terapia Celular em Problemas Musculares

3.1.1 Cardiopatias

As insuficiências cardíacas causadas pela perda ou disfunção das células musculares do coração, onde o coração e a circulação se tornam incapazes de satisfazer as demandas metabólicas do corpo, tem causas diversas. Essas podem ser por toxicidade medicamentosa, isquemia, endocardiose, endocardite, defeito no septo, hipertensão sistêmica, cardiomiopatia hipertrófica, entre outros. Atingem animais de diferentes idades,

principalmente, os mais velhos, variando conforme a causa primária (CARLTON; MCGAVIN, 1998).

A insuficiência cardíaca vem aumentando em decorrência do aumento da expectativa de vida dos animais de companhia e tem sido mais diagnosticada pelos médicos veterinários em virtude do maior cuidado e interesse dos proprietários para com estes animais. O diagnóstico rápido e o tratamento acarretam em melhor qualidade de vida, diminuição da morbidade e menor mortalidade. Os tratamentos medicamentosos não são efetivos na regeneração das áreas afetadas do órgão, somente na redução dos sinais clínicos. A reavaliação periódica destes pacientes é fundamental, pois tem que ser feito ajuste das doses conforme a progressão da doença (BIRCHARD; SHERDING, 2008). Com isso, o avanço das terapias celulares vem ganhando despertando interesse no seu tratamento, como uma possível “cura” das lesões cardíacas, porém ainda estão sob investigação.

Estudos com células-tronco embrionárias humanas demonstraram a diferenciação destas células em cardiomiócitos *in vitro*, com a presença de células “pulsantes” derivadas de corpos embrioides. Além da sua diferenciação, a funcionalidade dessas células depende também da capacidade de interação com as demais células do miocárdio lesionado, desenvolvimento das propriedades mecânicas e eletrofisiológicas e do seu sincronismo com os demais cardiomiócitos (REHEN; PEREIRA; MUOTRI, 2007). Ainda, há relatos da diferenciação de células mononucleares da medula óssea (CMMO) em cardiomiócitos e sua contribuição para a angiogênese (DIMMELER; ZEIHNER; SCHNEIDER, 2005), o que leva ao aumento da expectativa de utilização destas células como terapia.

Beltrami *et al.* (2003) descreveram uma população de células-tronco cardíacas que expressavam na sua superfície c-kit e com potencial de migração e reparo de lesões isquêmicas do miocárdio (SOARES; GARCIA; SANTOS, 2007). Min *et al.* (2003) em seu estudo enxertou cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias murinas em ratos com infarto do miocárdio, isso resultou em um efeito angiogênico e, posteriormente, melhora da função cardíaca durante o período de observação de 32 semanas.

Além da sua transformação das CT em células cardíacas, novas pesquisas vêm surgindo a respeito da neovascularização e de sua importância em insultos isquêmicos cardíacos, através das células progenitoras endoteliais, o que levaria a redução da apoptose dos miócitos (TUCHE; DOHMANN; CARVALHO, 2007). Stamm e cols. relataram uma melhora em pacientes humanos na perfusão pericárdica e a segurança da injeção traspericárdica de CTMO nas áreas de fibrose miocárdica.

3.1.2 Distrofia Muscular

Há vários tipos de distrofia muscular, onde o termo é utilizado para determinar o grupo de doenças que pode ser causada pela deficiência de distrofina, de merosina (α -Laminina) ou de sarcoglicano. A distrofia muscular já foi reconhecida em cães, gatos, bovinos, ovinos, camundongos, galinhas e hamsters (CARLTON; MCGAVIN, 1998). A mais conhecida é distrofia muscular canina por deficiência de distrofina (DMD) que é uma doença severa, de origem genética, ligada ao cromossomo X. É uma doença homóloga a distrofia muscular de Duchenne nos humanos. Acomete, principalmente, cães machos, entretanto fêmeas também podem adoecer. Contudo, existem fêmeas que são apenas portadoras e carecem do gene de transcrição Duchenne e de seu produto proteico, a distrofina, causando a sua deficiência. Os relatos são mais encontrados em animais Golden Retriever, porém outras raças podem ser afetadas, como Irish Terrier, Samoyed, Rottweiler, Labrador, entre outros. (BIRCHARD, 2008) A deficiência provoca a degeneração progressiva do músculo, principalmente estriado, e os sinais iniciam logo no começo da vida do animal, com 10 a 12 semanas de idade e incluem raquitismo, fraqueza, disfagia, anormalidades de andar e atrofia ou hipertrofia muscular, podendo ocasionar falha nos músculos respiratórios e causar a morte do animal. A disfagia e a hipersalivação podem ser em virtude do aumento maciço da língua (NELSON; COLTO, 1994). No exame bioquímico podemos notar a elevação sérica da creatina cinase (CK) devido a degeneração muscular (ARAÚJO *et al.*, 2009)

Ainda não há cura para esta doença, contudo terapias gênicas e celulares surgem como uma solução para a DMD, onde as células-tronco apresentam um potencial para restaurar a expressão de distrofina e, por conseguinte, o parênquima muscular (ZUCCONI, 2009). Estudos com células-tronco isoladas do músculo esquelético de cães saudáveis e injetadas de forma sistêmica em cães distróficos imunossuprimidos, contribuíram para a regeneração da fibra muscular, reposição de células satélites e expressão de distrofina e resultou na expressão de longo prazo desta proteína, limitou-se a lesão muscular e houve o aumento da atividade de regeneração e restrição de expansão intersticial. Estes resultados demonstraram que esta seria uma boa fonte terapêutica para os animais com distrofia (ROUGER *et al.*, 2011). Nitahara-Kasahara (2012), em seu estudo, também obteve êxito no enxerto de CTMs injetado por via intramuscular ou sistêmica e mostrou ser uma fonte promissora de tratamento da DMD.

Há relatos onde mesoangioblastos caninos foram injetados via arterial e resultaram na recuperação da expressão de distrofina, na morfologia e função muscular, com

uma notável melhoria clínica e preservação da motilidade e redução sérica da CK (SAMPAOLESI *et al.*, 2006).

Porém, alguns estudos como o de Dell’Agnola (2004), mostraram-se ineficazes na utilização da terapia celular. A terapia celular para cura desta doença ainda esta em fase de experimento e pode servir como possibilidade terapêutica em animais e humanos com distrofia muscular, porém faltam resultados que comprovem sua aplicação terapêutica.

3.1.3 Lesão de Tendão

Os tendões são tecidos especializados fibroso feito de fibroblastos especializados chamados tenócitos e uma matriz extracelular rica em colágeno. Fazem a ligação entre os músculos e o esqueleto, os quais transmitem a força muscular ao osso, permitindo a movimentação do corpo. Eles possuem alta resistência mecânica, boa flexibilidade e um nível bom de elasticidade. A fisiologia e patologia deste tecido são dependentes dos estímulos mecânicos, a força de tração é relacionada com a espessura do mesmo. São pouco irrigados e possuem baixa taxa metabólica (SMITH *et al.*, 2003).

Afecções dos tendões são frequentes causam morbidade substancial, tanto no esporte quanto no trabalho dos animais, principalmente dos cavalos. Elas podem ser em virtude do seu uso excessivo ou degeneração relacionada à idade do animal. As lesões traumáticas geralmente tem prognóstico ruim, em virtude do alto tempo de cicatrização e da qualidade do tecido formado (SOUZA *et al.*, 2011). Além disso, o tecido lesionado não se regenera totalmente e a organização, estrutura e propriedades mecânicas do tendão reparado são inferiores ao tendão saudável (TOMIOSSO, 2008).

Estudos relataram o isolamento de células-tronco derivadas do tendão, as quais são clonogênicas, autorrenováveis com potencial multipotente, levando estas células a osteogênese, adipogênese e condrogênese. A descoberta de que as células-tronco do tendão possuem capacidades regenerativas cria a possibilidade do tratamento deste tecido danificado (TOMIOSSO, 2008).

Há três diferentes abordagens baseadas em células-tronco mesenquimais, atualmente usada para o tratamento de lesões de tendão e ligamento ou cartilagem em cães e cavalos. O primeiro é baseado em cultura expandida de uma população de células derivadas da medula óssea, o segundo é derivado da medula óssea, mas utiliza um misto de células concentradas, o terceiro emprega população de células mistas nucleadas derivadas do tecido adiposo (FORTIER; TRAVIS, 2011).

Sakabe e Sakai (2011) realizaram diversos estudos sobre a utilização da terapia celular em lesões de tendões e concluíram que houve o recrutamento de CTMs para acelerar a reparação e regeneração do tecido *in vivo* em tendões lesionados de coelho. Entretanto, nesse estudo não foram observadas diferenças significativas nas propriedades mecânicas entre os tecidos que receberam CTMs e os não transplantados. Além disso, 28% dos tendões tratados com a terapia celular desenvolveram focos de osso ectópico.

Algumas pesquisas com células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMOs) em lesões de tendão mostraram que os que receberam os implantes tiveram efeitos positivos, tanto em termos de organização como de composição e mecânica tecidual, variando acerca do número de células implantadas ($0,5$ a 1×10^7), o veículo de suspensão (plasma, solução salina tamponada com fosfato), sobrenadante e o tempo de aplicação pós-lesão - mais de duas semanas - (FORTIER; TRAVIS, 2011).

Estudos demonstraram uma melhora na cicatrização primária do tendão e um melhor alinhamento dos feixes de colágeno no grupo que recebeu células-tronco derivadas de tecido adiposo (UYSAL *et al.*, 2012). Assim como Young *et al.* (1998), em seu estudo concluiu que a utilização de CTMs melhorou significativamente a biomecânica, estrutura e, provavelmente, a função do tendão de Aquiles após o tratamento, em relação ao grupo controle.

Pacini *et al.* (2007) demonstraram que 90% dos cavalos tratados com CTMMO retornaram as suas funções atléticas pré-lesão com êxito, além de não sofrerem novas lesões do tendão flexor superficial digital após dois anos, enquanto a outra população de cavalos monitorada que não utilizaram a terapia celular, voltaram a sofrer lesões.

Smith *et al.* (2003) utilizou CTMs derivadas de medula óssea autólogas de equinos, após sua expansão *in vitro*, se mostrando eficaz na regeneração do tendão flexor superficial dos animais tratados com lesão do tendão. Já Nixon *et al.* (2008), induziu em cavalos tendinite, através de colagenase, em oito animais, os animais foram tratados com injeção de células tronco derivadas do tecido adiposo. O grupo tratado mostrou melhora na organização do tendão, a qual foi avaliada pela expressão proteica oligomérica da matriz da cartilagem.

3.2 Terapia Celular em Doenças Neurológicas

O estudo das células-tronco nas patologias do sistema nervoso ainda é pouco estudado, embora haja muitos estudos demonstrando a diferenciação das células-tronco

derivadas de fontes em células nervosas. Até poucos anos atrás, acreditava-se que o sistema nervoso não se regenerava. Contudo, nos anos 90, surgiu o conceito da neuroregeneração ou neurologia regenerativa, o que fez com que despertasse teorias sobre a capacidade de reparação das doenças degenerativas (FALAVIGNA, 2007). Estudos demonstraram que o sistema nervoso central possui a capacidade de responder a lesão através do aumento da produção celular e da tentativa de regeneração (RICE; SCOLDING, 2004). Além disso, foi observado que novos neurônios são gerados continuamente no sistema nervoso adulto e se integram em circuitos funcionais. Porém estes são gerados apenas, em condições normais, em duas regiões específicas: na camada subgranular do giro denteado do hipocampo e na zona subventricular próxima aos ventrículos laterais (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007). Há três eventos principais que devem estar inter-relacionados e que marcam a neuroregeneração: a proteção endógena por fatores de crescimento, neurogênese e neuroregeneração (COSTA, 2012).

As doenças neurológicas, geralmente, não possuem um prognóstico favorável, devido o mecanismo do sistema nervoso ser extremamente complexo e causam danos, frequentemente, irreversíveis. Por mais que o SNC abrigue células com potencial regenerativo, ele não consegue recrutá-las de maneira efetiva (CARRION *et al.*, 2009). Portanto, a terapia celular surge como esperança no tratamento de lesões degenerativas e traumáticas. O ideal seria utilizar as células-tronco neurais do próprio indivíduo a ser tratado (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007), mas já se sabe que células-tronco derivadas de outras fontes podem se diferenciar e serem utilizadas nas terapias. Geralmente as células de eleição nestas terapias seriam as embrionárias, entretanto, são estudadas também as derivadas de medula óssea e do sangue do cordão umbilical, estas são mais seguras se comparado as anteriores, mas não tem o mesmo potencial de diferenciação (NARDI; BRAGA; CAMASSOLA, 2013).

Os problemas mais comuns que atingem o sistema nervoso dos cães são: epilepsias, discopatias e infecção pelo vírus da cinomose. As neuropatias traumáticas são comuns e ocorrem devido a golpes mecânicos, fraturas, pressões, estiramentos, lacerações ou a injeções de agentes no interior ou arredores dos nervos. Além destas, outras doenças neurológicas também são, relativamente, frequentes como a síndrome da cauda equina, síndrome de Wobbler, subluxação atlanto-axial, doenças do sistema vestibular, lesões cerebelares, neoplasias encefálicas e das meninges, infecções neurológicas, doenças degenerativas (mielopatia degenerativa e síndrome cognitiva do cão idoso), isquemia cerebral, entre outras (DOCTOR.VET, 2013).

Estudos em roedores demonstraram a capacidade de mielinização de axônios das lesões espinhais através da diferenciação das células-tronco embrionárias humanas em oligodendrócitos, o que promoveu uma melhoria funcional, devido a secreção de fatores tróficos ou remielinização dos axônios (KEIRSTEAD *et al.*, 2005).

3.2.1 Lesões na Coluna Vertebral

As lesões de coluna são uma das causas mais comuns de problemas locomotores dos animais, podendo ser ocasionada por inúmeros fatores, sendo os acidentes de trânsito um dos grandes motivos para o desenvolvimento destes problemas. Além disso, pode estar associada a raça, idade e sexo. As causas mais comuns da disfunção da medula espinhal podem ser de origem aguda (traumatismo, hérnia de disco intervertebral tipo I, embolismo fibrocartilaginoso), subaguda (discoespondilite), progressiva crônica (neoplasia, hérnia de disco intervertebral tipo II, síndrome da cauda equina ou malformações das vértebras cervicais) e, por fim, progressiva em jovens, a luxação atlantoaxial (ARAÚJO, 2011). Estas disfunções podem acarretar lesões sérias na medula, o que pode levar a problemas locomotores graves e irreparáveis, dependendo do tempo. O trauma medular é, relativamente, frequente e deve ser considerado emergencial, limitando a extensão dos danos ao tecido neuronal e favorecendo a recuperação neurológica do paciente (ARIAS *et al.*, 2007). A sintomatologia das lesões de coluna podem ter sinais clínicos progressivos ou não progressivos e variam conforme o local atingido, podendo ser cervical: C1 a C5; cervicotorácica: C6 a T2; toracolombar: T3 a L3 ou na lombossacra: L4 a S3 (BIRCHARD; SHERDING, 2008).

As discopatias são alterações nos discos localizados entre as vértebras, o que ocasiona a compressão da medula espinhal ou de alguma raiz nervosa, levando a dor intensa até a perda da sensibilidade e paralisia dos membros, além de poder levar a retenção urinária e retenção fecal (BIRCHARD; SHERDING, 2008). Lesões agudas da coluna vertebral são comuns em caninos e felinos que levam à perda de tecido, incluindo feixes de fibras mielinizadas encarregadas dos impulsos nervosos. Este tipo de lesão é vista com grande desânimo entre os médicos veterinários pela baixa taxa de recuperação destes pacientes (GADE *et al.*, 2012).

As células-tronco, neste caso, têm o objetivo de reconstituir a comunicação entre o cérebro e dos membros (JEFFERY *et al.*, 2001). O tratamento com as células-tronco vem dando esperança para estes casos, como tem sido demonstrado em diversos estudos. Ryu

(2009), em seu estudo, demonstrou a melhora da função neurológica em cães com lesão da medula espinhal quando aplicado células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMAs), onde houve a melhora da velocidade de transmissão.

Em sua pesquisa, Park *et al.* (2012) fez a utilização de CTMAs induzidas à diferenciação neuronal, juntamente com Matrigel (*scaffold*), onde em comparação com os animais controle, tiveram uma melhora significativa e apresentaram maior apoio sobre as patas traseiras e redução da fibrose. Além disso, a expressão de neurotrofinas, como o fator de crescimento do nervo (NGF) e neurotrofina-3 foi aumentada, os marcadores inflamatórios COX2 e interleucina-6 (IL-6) foram diminuídos, Cdc42 e Rac1 foram aumentados e vários outros marcadores de regeneração neural foram aumentadas. Como foi associado CTMAs com Matrigel, acredita-se que os efeitos anti-inflamatórios estruturais e potenciais do Matrigel possam ter melhorado a eficácia das células-tronco mesenquimais neuro-induzidas.

Dasari *et al.* (2007) investigaram sobre a remielinização axonal em lesões da medula espinhal através da utilização de células-tronco do cordão umbilical. Por sua vez, constatou a diferenciação destas em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, além do aparecimento de bainhas de mielina em torno dos axônios nas áreas lesionadas da medula espinhal e de seu melhor potencial de integração nas vias axonais, aumentando assim a velocidade da condução nervosa. Ainda foi relatado que as células-tronco derivadas do sangue do cordão umbilical ajudam na síntese de proteína básica de mielina (MBP) e proteína proteolipídica (PPL) nas áreas lesadas, facilitando o processo de remielinização. Com isso, houve o aumento da função locomotora em 14 dias após o tratamento, em comparação com o grupo controle.

Zhao *et al.* (2002), em seu estudo, demonstraram a melhora sensorial de ratos afetados por acidente vascular cerebral induzido a partir da utilização de células-tronco derivadas da medula óssea humana, após serem enxertadas ao redor da área de infarto uma semana após a isquemia cerebral. Fricker *et al.* (1999) e Ostefeld *et al.* (2000) demonstraram que os neurônios maduros derivados do enxerto são observados até seis semanas após a implantação. Vários estudos sugerem que os fatores neurotróficos desempenham papéis importantes na plasticidade cerebral. Eles podem melhorar a germinação (reorganização axonal), sinaptogênese, potenciação de longo prazo (LTP), e neurotransmissão, além de aumentar a liberação de neurotransmissores (ZHAO *et al.*, 2002).

3.2.2 Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral é ocasionada pela obstrução do fluxo sanguíneo ou redução do oxigênio disponível no sangue ou outras circunstâncias, como distúrbios metabólicos associados a deficiência nutricional e intoxicações, que venham a interferir no aporte sanguíneo no cérebro, podendo ser classificada em focal ou global. A focal é devido à falta de irrigação em uma região isolada do cérebro e é ocasionada, geralmente, por êmbolos, trombos e ateromas (KUMAR *et al.*, 2008). Já a isquemia cerebral global é mais grave, pois há a diminuição da perfusão generalizada no cérebro, que pode ser acarretado por paradas cardiorrespiratórias, ou por hipotensão severa. Essa diminuição da perfusão sanguínea no cérebro acarreta lesões no cérebro devido à queda da oxigenação e podem variar conforme o local onde ocorreu.

As células neuronais possuem diferentes sensibilidades, sendo os neurônios os mais atingidos pela isquemia, seguido pelos oligodendrócitos, astrócitos, micróglia e elementos fibrovasculares de sustentação (SYRING, 2005). Há regiões que são mais ou menos sensíveis, variando conforme a demanda metabólica pelos neurônios. As primeiramente afetadas são hipocampo, córtex cerebral, tálamo e núcleos de base (MENDES, 2012). O tempo é vital para determinar a gravidade da lesão. A diminuição da função neuronal não significa que haverá morte neuronal e que será irreversível (OHTAKI *et al.*, 2005).

No animal, macroscopicamente podemos ver áreas de infarto no cérebro, caracterizada por uma zona de necrose liquefativa ou por um espaço vazio após a absorção da necrose (MENDES, 2012). A cascata isquêmica pode ocorrer pela diminuição de 20 a 30% ou mesmo pela redução completa do fluxo sanguíneo cerebral, onde o tempo determinará a extensão e gravidade da lesão (OHTAKI *et al.*, 2005). A cascata é pelo desencadeamento de diversos efeitos secundários a isquemia, onde inicia a respiração celular anaeróbia, formação de lactato e queda do pH das células nervosas. Outro mecanismo é o influxo do cálcio, que pode levar a lesão citotóxica pela liberação de mediadores inflamatórios e metabólitos tóxicos do processo de inflamação promovendo neurocitotoxicidade. Essa disfunção poderá levar a danos celulares irreparáveis e pode ocasionar lesões nas regiões adjacentes à área isquêmica (TIMM; FLEGEL; OECHTERING, 2008).

A reperfusão cerebral - restabelecimento do fluxo sanguíneo na área da lesão é um tratamento efetivo quando realizada o mais rápido possível. Entretanto, caso haja o retorno abrupto pode haver alterações indesejáveis, levando a exacerbação das reações bioquímicas e início da formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, que são danosos às células (MENDES, 2012).

A isquemia não é diagnosticada com frequência na medicina veterinária, geralmente são achados de necropsia de animais com lesões neurológicas graves de caráter idiopático (GAROSI, 2010). Há relatos de isquemia cerebral focal em cães idosos com aterosclerose em decorrência de hipotireoidismo; casos de nefropatia crônica em cães e gatos, como sendo a causa primária da hipertensão sistêmica; a síndrome da disfunção cognitiva (SDC) tem sido associada ao débito cardíaco em felinos, o que predispõe a hipóxia cerebral, principalmente em animais cardiopatas, diabéticos ou com histórico de coagulopatias (MENDES, 2012). Já a isquemia global é relatada em pacientes com déficits neurológico, respiratório e cardíaco, sendo mais predispostos por já apresentarem um quadro hipoxêmico. Estes animais, quando submetidos a anestesia, podem ter bradicardia, acarretando na dificultando da perfusão sanguínea e, conseqüentemente, na oxigenação cerebral (GODOI *et al.*, 2009; TIMM *et al.*, 2008). A hipertensão intracraniana, em animais com traumatismo craniano, por exemplo, é um fator determinante na isquemia cerebral global, além de repetidos quadros convulsivos ou de longa duração, devido ao esgotamento das reservas energéticas (MENDES, 2012).

Há relatos de alguns estudos como o uso de CTMs da polpa dental, como alternativa terapêutica para os danos neurológicos associados à hipóxia cerebral, onde os resultados sugeriram uma melhora no déficit cognitivo dos animais tratados com CTMs (MENDES, 2010). Em roedores foi demonstrado que a infusão intravenosa de células da medula óssea, bem como do cordão umbilical induzem angiogênese, neovascularização e neurogênese na zona peri-isquêmica (TAGUCHI *et al.*, 2004). Também foi verificado que a transferência de células do cordão umbilical em ratos submetidos à isquemia cerebral experimental reverte déficits comportamentais e reduz a área de infarto cerebral (VENDRAME *et al.*, 2004). Estudos vêm demonstrando o benefício do uso das CTs devido ao aumento da sobrevivência celular e angiogênese, melhorando a formação sináptica e reduzindo a resposta inflamatória e cicatriz glial (COSTA, 2012).

3.2.3 Síndrome do Distúrbio Cognitivo

Os animais possuem grande habilidade de aprendizado, o que podemos constatar pelo seu uso em diversas funções, tais como cães farejadores, cães guias, pelas simples funções cotidianas de urinar e defecar em certos lugares, até mesmo o adestramento demonstra sua capacidade de aprendizado e memória. Os cães são considerados idosos a

partir dos oito anos de idade, dependendo do porte, baseando-se em evidências da redução da função cerebrovascular a partir desta idade (HEAD, 2001) e os gatos a partir dos doze anos.

A síndrome do distúrbio cognitivo (SDC), conhecida popularmente como doença de Alzheimer dos animais, acomete cães e gatos e está, geralmente, relacionada à senilidade. Com o aumento da expectativa de vida dos animais de companhia esse tipo de disfunção acaba sendo mais frequente. Ainda não se sabe a causa exata deste problema, mas são relatadas alterações das funções de aprendizagem, memória, consciência e percepção (PANTOJA, 2010).

Estudos demonstraram a formação de placas senis formadas pelo acúmulo de β -amilóide ($A\beta$), que se acumulam principalmente no hipocampo e no córtex frontal (BALBUENO, 2012). Este depósito se assemelha ao que ocorre na síndrome de Alzheimer, nos humanos (COTMAN *et al.*, 2002). A extensão da deposição de $A\beta$ se correlaciona com o déficit cognitivo (CUMMINGS *et al.*, 1996). Embora a acumulação de $A\beta$ faça parte de uma série de eventos neuropatológicos, é pouco provável que seja o único fator que contribui para o declínio cognitivo (COTMAN *et al.*, 2002), para isso são necessários mais estudos para conhecer a neuropatologia desta doença. Há certa dificuldade na diferenciação e diagnóstico do envelhecimento normal e patológico onde a melhor forma de diagnosticar a SDC é por exclusão de outras doenças (BIRCHARD; SHERDING, 2008).

É caracterizada pela mudança de comportamento dos animais, principalmente pelas alterações na orientação, interação socioambiental, ciclo de sono-vigília, treinamento higiênico e outras atividades realizadas pelo cão (PANTOJA, 2010). Os sinais clínicos são variáveis e muitas vezes passam despercebidas pelos seus tutores, sendo típico dos animais com este distúrbio o comportamento destrutivo, a micção ou a defecação em locais inapropriados, a vocalização excessiva principalmente à noite, o olhar fixo para a parede, pressão da face em superfícies, dorme mais durante o dia e menos durante a noite, andar sem rumo, a diminuição da resposta a estímulos verbais, a demência, não reconhecimento das pessoas, solicita menos atenção, menor receptividade, entre outros (CURTIS, 2010).

As principais mudanças morfofisiológicas encontradas são a atrofia cortical, aumento do tamanho dos ventrículos, diminuição da quantidade de neurônios e principalmente a redução de antioxidantes endógenos e o acúmulo de β -amilóide. Além disso, apresentam alterações vasculares e espessamento de meninge (COSTA, 2012).

Estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de restaurar a função de doenças degenerativas como a doença de Alzheimer (LINDVALL; KOKAIA, 2010) e, por conseguinte, se acredita no seu potencial terapêutico, também, para a síndrome do distúrbio

cognitivo. A substituição neuronal visando à restauração funcional é muito complexa, pois as células-tronco têm que ser pré-diferenciadas, *in vitro*, em muitos diferentes tipos de neuroblastos antes de serem implantados em várias áreas do cérebro.

No experimento de Kim *et al.* (2013), a injeção de células-tronco derivadas da membrana amniótica de humanos (AMSCs) em camundongos mostrou uma melhora significativa e duradoura na doença de Alzheimer e melhoria na função de memória via mecanismos imunomoduladores e parácrinos. Além destes estudos já citados, outros também vêm avançando, com a possibilidade de tratamento para estas doenças neurodegenerativas (LIVESEY, 2012, GOUGH, 2007).

3.2.4 Sequela de Cinomose

A cinomose canina é uma doença infectocontagiosa, causada por um *Morbilivirus* da Família *Paramyxoviridae*. Pode acometer cães de diferentes idades, raça e sexo, mas com predileção por animais jovens e não-vacinados. Tem sintomatologia mutissistêmica e possui elevada taxa de mortalidade. Os principais sinais observados são: cegueira, convulsões, ataxias cerebelar, vestibular ou sensorial, mioclonias, anorexia, corrimento nasal e ocular, febre, tosse e vômito (VANDEVELDE; CACHIM, 1992). A morte geralmente resulta de acentuado envolvimento do sistema nervoso central (SNC) ou da infecção bacteriana secundária (CARLTON; McGAVIN, 1998).

Pode ter apresentações clínicas agudas, subaguda ou crônica, com manifestações cutâneas, gastroentéricas, oftálmicas, respiratórias e neurológicas. Na maioria das vezes a cinomose gera sequelas neurológicas nos animais, resultando de lesões degenerativas e/ou inflamatórias do SNC (BIRCHARD; SHERDING, 2008). Ela não tem um prognóstico favorável, geralmente, e por mais que o cão consiga sobreviver fica com sequelas neurológicas, decorrentes da infecção.

A cinomose é uma das principais causas de eutanásia nos cães, devido sua alta morbidade, alta mortalidade e, mesmo depois do animal tratado, deixa lesões neurológicas variáveis, podendo ser de caráter permanente, como paraplegia, hiperestesia, tremores, deambulação em círculos, convulsões parciais e generalizadas e mioclonias (HOSKINS, 2004). Alguns pesquisadores, visando desenvolver uma nova abordagem terapêutica, vêm fazendo testes com o uso de células-tronco no tratamento destas sequelas, mesmo assim ainda há poucos artigos relacionados ao uso da terapia celular nas sequelas de cinomose, mesmo sendo umas das principais doenças que atingem o SNC dos cães.

Um estudo realizado por Brito *et al.* (2010) com injeção de células mononucleares de medula óssea alogênicas evidenciou que o tratamento durante a fase virêmica da doença é ineficaz. Porém a opção terapêutica proporcionada pela injeção sistêmica de células mononucleares de medula óssea alogênicas demonstrou ser uma opção segura e promissora para o tratamento das sequelas neurológicas de cinomose em cães.

Experimentos demonstraram que injeções heterólogas de células mononucleares de medula óssea em cães sem raça definida (SRD) com sequelas neurológicas causadas por cinomose tiveram remissão dos sinais, na maior parte dos indivíduos e não houve formação de neoplasia após oito meses de acompanhamento (SANTOS, 2010).

3.2.5 Epilepsia

A epilepsia é um problema crônico, onde há a ocorrência de convulsões recidivantes, entre as quais o animal fica consciente. É uma das patologias neurológicas mais comuns no cão e no gato, onde estima-se que a prevalência varie entre 1,5 a 5,7% no cão e 0,5% no gato. Podem ter causa idiopática, em virtude de um problema hereditário do cérebro, ou adquiridas ou primárias, como resultado de uma agressão cerebral que produz lesão cerebral residual. São classificados de acordo com a causa em idiopática em extracranias (toxinas, doenças metabólicas, hipoglicemia, doença hepática, distúrbios eletrolíticos, uremia grave) ou intracraniais (malformações congênicas, hidrocefalia, neoplasia, doença inflamatória ou infecciosa, encefalite necrosante, meningoencefalite granulomatosa). A idiopática é a causa mais comum em cães e surge unicamente, sem que haja qualquer lesão cerebral subjacente ou outros sinais neurológicos além das convulsões (BIRCHARD; SHERDING, 2008).

Na epilepsia um grupo de células cerebrais se comporta de maneira hiperexcitável, podendo ser causada por qualquer condição que afete o córtex cerebral, como consequência de anomalias congênicas, infecções, intoxicações, tumores, doenças vasculares, doenças degenerativas ou lesões traumáticas (RIGATTI; BITTENCOURT, 1999). Isso gera manifestações clínicas caracterizadas por alterações estereotipadas paroxísticas no comportamento (LORENZ; KORNEGAY, 2006). São classificadas em epilepsia focal, quando ocorre em apenas um hemisfério cerebral, ou generalizada, quando ocorre nos dois hemisférios, sendo a segunda a forma mais comum na medicina veterinária. As crises podem ser do tipo tônico-clônicas, tônicas, clônicas, atônicas ou mioclônicas (BIRCHARD; SHERDING, 2008). A mais característica são as tônico-clônicas, durando entre 1 a 2 minutos.

A apresentação clínica vai depender da localização e extensão da descarga convulsiva, podendo variar bastante (BIRCHARD; SHERDING, 2008).

Acredita-se que talvez haja uma origem genética, com maior prevalência em animais de raças puras como o Pastor Alemão, o Pastor Belga, o Beagle e os Daschunds e seja dependente da idade, sendo que a maioria dos animais afetados têm idades compreendidas entre um a cinco anos, porém isso não é confirmado. É comumente observado também em São Bernardo, Cocker, Setter Irlandês, Boxer, Husky, Border Collie e Poodle, podendo ter caráter hereditário (BIRCHARD; SHERDING, 2008)

Não há tratamento curativo, só medicamentos que auxiliam a controlar as convulsões, reduzindo o número e a gravidade. A terapia celular vem como forma alternativa de tratamento desta doença. A maioria dos estudos com a finalidade de tratamento da epilepsia utilizam células progenitoras neurais ou células fetais em modelos experimentais. Entretanto, a utilização de células-tronco de medula óssea tem se destacado nas pesquisas. Pesquisas demonstraram que as crises epiléticas pode induzir a neurogênese, assim como a isquemia cerebral (PARENT *et al.*, 2003), o que desperta uma maior necessidade de compreensão desta forma de regeneração neurológica. Pesquisas propõe que o transplante de células-tronco da medula óssea protege e/ou previne a progressão da epilepsia crônica. (FERRO, 2008).

Em seu estudo, Chu *et al.*(2004) relatou redução drástica na frequência de crises epiléticas em ratos induzidos com pilocarpina, que receberam o transplante intravenoso de células-tronco neurais humanas obtidas da zona ventricular de embriões. Carrion *et al.*(2009) descreveram que ao administrar células da camada mononuclear da medula óssea via intravenosa, verificou a migração das células transplantadas até o cérebro epilético e concluiu que apenas 20% dos animais do grupo transplantado apresentaram crises espontâneas recorrentes 120 dias após o transplante.

Jeon *et al.* (2011) obteve resultados que indicaram que as células-tronco de tecido adiposo de humanos evita ou inibe o desenvolvimento da epilepsia e, por conseguinte, tem efeito antiepileptogênicos no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina em ratos. O estudo sugere que esta pode ser uma fonte potencial para a terapêutica não invasiva de animais com epilepsia.

3.2.6 Parkinson Canino

Pesquisas a respeito do Parkinson humano tem desvendado e auxiliado muito no desenvolvimento da patogenia e dos avanços no tratamento do Parkinson canino. Os estudos com cultura de células-tronco tem recebido atenção especial, pois estas demonstraram a capacidade de regeneração pós-trauma, mas não somente na pesquisa básica neurogênica, mas também no tratamento das doenças degenerativas em humanos, como a doença de Parkinson (CORRAL *et al.* 2003, LI; FIELD; RAISMAN, 2005, ZHANG *et al.* 2006). As terapias celulares visam substituir os neurônios dopaminérgicos que degeneram na doença, ou ainda, proteger os que ainda não foram perdidos (MENDEZ-OTERO, 2007).

Trounson *et al.* (2011), em seu estudo com humanos, demonstraram que a utilização de CTNs cultivados *in vitro* por vários meses, teve resultados significativos dos pacientes que receberam as CTNS autólogas, se comparado com o grupo controle. Estes estudos levam a crer que há potencial terapêutico das células-tronco no tratamento dessa enfermidade.

3.2.7 Doença do Neurônio Motor Inferior

O neurônio motor inferior, junto com o neurônio sensitivo, compõe o arco reflexo. Seus corpos celulares se encontram na região ventral da substância cinzenta e seus axônios emergem da medula espinhal nas raízes ventrais e passam através dos plexos lombossacrais e braquiais para formarem os troncos nervosos periféricos para os membros (GONSALEZ, 2009). Os membros pélvicos são, frequentemente, mais acometidos do que os torácicos, inicialmente, com paralisia ascendente, até que os quatro membros sejam acometidos (NELSON; COUTO, 1994).

A doença do neurônio motor inferior (DNMI) tem caráter idiopático e progressivo, onde há a perda aguda de células córneas ventrais da medula espinhal (BIRCHARD; SHERDING, 2008). Relatada em diferentes raças é um distúrbio autossômico hereditário, caracterizada pela degeneração prematura de neurônios motores, principalmente, da medula espinhal e em graus variados, no tronco cerebral. Ela causa debilidade neuromuscular (paraparesia ou tetraplegia) que progride por duas a quatro semanas até a eutanásia, mas as funções sensitivas e autônomas são preservadas. O tônus muscular fica diminuído, e todos os reflexos espinhais estão diminuídos ou ausentes (NELSON; COUTO, 1994). Há a rápida atrofia da musculatura (BIRCHARD; SHERDING, 2008), pela denervação.

É uma doença que não possui um tratamento eficaz, portanto o uso de células-tronco surge como candidato à terapia. A investigação vem sendo desenvolvida, principalmente na patologia humana conhecida como Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a qual possui patogenia semelhante à DNMI. Até o momento, a terapia com a simples administração das células-tronco nos locais onde há degeneração celular tem sido sem sucesso. Voltarelli (2004), em seu estudo, obteve metade dos pacientes não houve benefício, alguns tiveram desaceleração da doença ou estabilização, não obtendo resultados significativos. Corti *et al.* (2007) testaram um tratamento a partir da estimulação *in vitro* de uma subpopulação de células-tronco neuronais as quais foram transplantadas para a coluna vertebral de camundongos. Os que receberam CTNs tiveram uma diminuição na progressão da doença e sobreviveram, aproximadamente, 23 dias a mais que o grupo controle.

4 CONCLUSÃO

Com este estudo, conclui-se que a terapia celular apresenta uma grande possibilidade de tratamento de diversas afecções do sistema nervoso e muscular, principalmente com o uso das células-tronco adulta, onde tem se desenvolvido muitos estudos a respeito de sua utilização e com bons resultados. Entretanto ainda faltam desenvolver estudos a seu respeito até a sua utilização em larga escala nas clínicas veterinárias. Antes, tem que estabelecer protocolos de isolamento, local de aplicação e doses. O uso das células-tronco visa à reparação da função das células e tecidos lesados, pela sua capacidade de diferenciação nas mais diversas células do organismo. As células-tronco tem se mostrado muito favoráveis ao uso em terapias de doenças como isquemias cerebrais e cardíacas, lesões de tendão, síndrome do distúrbio cognitivo, cinomose, epilepsia, Parkinson, porém ainda não se tem certeza de como elas atuam e se servirão como tratamento, ou quem sabe, cura para doenças. Com isso, deve-se investir mais em pesquisas a respeito das células-tronco, para assim abrir a possibilidade de tratamento das atuais doenças intratáveis.

5 REFERÊNCIAS

- ALVES, F. R. *et al.* Establishment of a protocol for obtention of neuronal stem cells lineages from the dog olfactory epithelium. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 363-372, abr. 2010.
- ARAÚJO, A. C. P. de. **Distúrbios da medula óssea**. Slides de aula - Medicina de Cães e Gatos, ministrada na UFRGS, Porto Alegre, 2011.
- ARAÚJO, K. P. *et al.* Aspectos clínicos das distrofias musculares em cães. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p. 89-102, 2009.
- ARIAS, M.; SEVERO, M.; TUDURY, E. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 115-134, jan-mar. 2007.
- ASANUMA H.; MELDRIM, D.; MELDRUM, K. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells to repair kidney injury. **Journal of Urology**, v. 184, n 1, p 26-33, 2010.
- BALBUENO. A. **Disfunção cognitiva em cães: revisão de literatura**. 2012, 41f. Trabalho de conclusão de curso de medicina veterinária. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2012.
- BELTRAMI, A. P. *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, v. 114, n. 6, p. 763-776, 2003.
- BIANCO, P. *et al.* Bone marrow stromal stem cell: nature, biology and potential applications. **Stem Cell**, v. 19, p. 180-191, 2001.
- BIRCHARD S.; SHERDING R. G. **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008, 2072p.
- BRASIL. Decreto-lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5o, 6o, 7o, 8o, 9o, 10 e 16 da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de março de 2005.
- BRETAG A. H. Stem cell treatment of dystrophic dogs. **Nature**, v. 450, n. 7173, p. 574-579, dez. 2007.
- BRITO, H. *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. **Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 24, p.26-29, 2010.

- BURDON, T. *et al.* Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. **Bone Marrow Research**, v. 2011, p. 1-14, 2011.
- CAHILL, L. Social ethics of embryo and stem cell research. **Women's Health Issues**, v. 10, n. 3, p. 131-135, mai-jun 2000.
- CAI, J.; WEISS, M.; RAO, M. In search of "stemness". **Experimental Hematology**, v. 32, n. 7, p. 585-598, 2004.
- CAMPAGNOLI, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cell in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood: The Journal of Hematology**, v.98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.
- CAMPOS L. S. Neurospheres: insights into neural stem cell biology. **Neuroscience Research**, v. 78, n. 6, p. 761-769, dez. 2004.
- CARLTON W. W.; McGAVIN M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 1998. 672p.
- CARRION, M. J. M. *et al.* Potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea no tratamento da epilepsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 112-119, mai. 2009.
- CARVALHO, A. M. *et al.* Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. **J. Equine Vet Sci**, v. 31, n. 1, p. 26-34, jan. 2011.
- CÉLULAS-TRONCO: Esperança para o Futuro da Medicina. **Blog Tratamento com Células-Tronco**. 29 de julho de 2009. Disponível em: <http://tratamentocomcelulastronco.blogspot.com.br/2009/07/o-que-e-uma-celula-tronco-celula-tronco.html>. Último acesso em 15 de julho de 2013.
- CHU K. *et al.* Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Research**, v. 1023, n. 2, p. 213-221, out. 2004.
- CIRNE-LIMA E. O. Clonagem. In: PASQUALOTTO, F. (Org.). **Células-tronco: visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007, p. 101-104.
- CLARKE, D. *et al.* Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, v.288, n. 5471, p.1660-1663, Jun 2000.
- COLLE, M-A. *et al.* Vascular and parenchymal A β deposition in the aging dog: correlation with behavior. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 5, p. 695-704, set. 2000.
- COLLINS C. A. *et al.* Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**. v. 122, n. 2, p. 289-301, jul. 2005.
- CORRAL R.D. *et al.* Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. **Neuron**, v. 40, p. 65-79, 2003.

CORTI S. *et al.* Neural stem cells - LewisX⁺ CXCR4⁺ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. **Brain**, v. 130, n. pt5, p. 1289-1305, mai. 2007.

COSTA, Bruna Grandi da. **Utilização de terapia celular em afecções neurológicas do sistema nervoso central**, 2012. 51p. Trabalho de conclusão de curso de medicina veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

COSTA, D. A. **Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais em ratos Wistar submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação**. 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociência). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

COTMAN, C. *et al.* Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 809-818, set-out. 2002.

COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 35-48.

CUMMINGS, B. *et al.* Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 66, n. 1, p. 11-23, jul. 1996.

CURTIS, T. M. **Cognitive dysfunction in dogs and cats**. In.: PROCEEDINGS OF THE LATIN AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, Oct. 25-27, 2010, Lima, Peru.

D'AMATI G. *et al.* Myocyte transdifferentiation: a possible pathogenic mechanism for arrhythmogenic right ventricular dysplasia. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, n. 2, p. 287-290, 2000.

DASARI, V. *et al.* Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 2, p. 391-410, fev. 2007.

DELL'AGNOLA, C. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 4311-4318, dez. 2004.

DEWEY, C. W. **Neurologia de Cães e Gatos: Guia Prático**. São Paulo: Roca, 2006, 352p.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.; SCHNEIDER, M. **Journal of Clinical Investigations**, v. 115, n. 3, p. 572-583, 2005.

DOCTOR.VET. Ortopedia. **Núcleo de Especialidades Veterinárias**, Brasília, 16 de julho de 2013. Disponível em: < <http://doctor.vet.br/especialidades/ortopedia-veterinaria> >. Acesso em: 16 jul. 2013.

DOJERTY, M. J.; CANFIELS, A. E. Gene expression during vascular pericyte differentiation. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 1999.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EMERICK, M. C.; MONTENEGRO, K. B.; DEGRAVE, W. Novas Tecnologias na Genética Humana: Avanços e Impactos para a Saúde, Projeto Ghente/GESTEC-Nit, Rio de Janeiro, 2007.

EVANS M.; KAUFMAN M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, n. 292, p. 154-156, jul. 1981.

FAGANELLO, S. B. *et al.* **Cultivo de células - tronco mesenquimais de medula óssea, tecido adiposo e polpa dentária de lagomorfos.** In : Livro de Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre, UFRGS, 2009. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/44497>>. Acesso em: 10 de julho de 2013.

FAGOT-LARGEAULT, A. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. *Estudos Avançados*, v. 18, n. 51, p. 227-245, mai-ago. 2004.

FALAVIGNA, A. Células-tronco: visão do especialista em neurologia e neurocirurgia. In: PASQUALOTTO, F. (Org.). **Células-tronco: visão do especialista.** Caxias do Sul: EDUCS, 2007, v. 1, p. 199-205.

FERRO, Z. S. M. **Transplante de Células Mononucleares da Medula Óssea na Epilepsia Experimental induzida por Lítio e Pilocarpina em Ratos.** Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - UFRGS. Porto Alegre, 2008.

FORTIER, L.; TRAVIS, A. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 2, n. 9, p. 1-6, fev. 2011.

FRANCA, A. G.; VICENTE, T. F.; CHAN, A. C. Células-tronco do sangue do cordão umbilical: o que são e suas aplicações. **IX Simpósio de Ensino de Graduação – IX Mostra Acadêmica – UNIMEP**, nov. 2011.

FRICKER, R. *et al.* Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience*. v. 19, n. 14, p. 5990–6005, jul. 1999.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN R. K.; LALYKINA, K. S. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Tissue Kinet*, v. 3, n. 4, p. 393-403, out. 1970.

FRITSCH M. *et al.* Células-tronco: aspectos gerais. In : PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco – Visão do especialista.** Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 19-82.

GADE, N. E. *et al.* Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Veterinary World*, v. 5, n. 8, p. 499-507, ago. 2012

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science*, v. 287, n. 5457, p.1433-1438, fev. 2000.

GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult brain. *The Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 3, p. 612-613, fev. 2002.

GAROSI, L. Cerebrovascular disease in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 40, n. 1, p. 66-79, jan. 2010.

- GEARHART, JD. *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proc Natl Acad Sci**, p.13726–13731, nov. 1998.
- GNECCHI M. *et al.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, nov. 2008.
- GODOI, D. *et al.* Retrospective study of anesthetic proceedings realized in dogs and cats undergoing neurosurgeries. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 171-180, jul. 2009.
- GONSALEZ, Patrícia Ponchio Benitez. **Lesão medular aguda e crônica em cães**. 2009. 67f. Trabalho de conclusão de curso de medicina veterinária – Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo.
- GOUGH, N. R., Stimulating neurogenesis to treat Alzheimer's disease. **Science Signaling**, v. 2007, n. 391, p. 213, Jun. 2007.
- GRINFELD, S; GOMES, R. Células-tronco: um breve estudo. **International Journal of Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 324-329, jan-jun. 2004.
- GRITTI, A.; VESCOVI, A.; GALLI, R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. **Journal of Physiology**, v. 96, n. 1-2, p. 81-89, jan. 2002.
- HAUGER, O, *et al.* MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy, **Radiology**, v. 238, n. 1, p. 200-210.
- HEAD, E. Brain aging in dogs: parallels with human brain aging and Alzheimer's disease. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 247-260, jan. 2001.
- HORWITZ, E. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.
- HOSKINS, J. Doenças virais caninas. In: ETTINGER, S.; FELDMAM, E. (Eds.) **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 88, p.440-6. 2004.
- JEFFERY, N. *et al.* Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation-from research laboratory to therapeutic application. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, p.428-432, set. 2001.
- JEON, D. *et al.* A cell-free extract from human adipose stem cells protects mice against epilepsy. **Epilepsia**. Vol. 52, p. 1617–1626, set. 2011.
- JOHNSON, J. *et al.* Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 303-312, jul. 2005.
- JUN, H. S. YOON, J. W. Approaches for the cure of type 1 diabetes by cellular and gene therapy. **Current Gene Therapy**, v. 5, n. 2, p. 249-262, abr. 2005.
- KEIRSTEAD, H. S. *et al.* Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4694-4705, mai. 2005.

KERN, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cell from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. **Stem Cell**, v. 24, n. 5, p.1294-1301, mai. 2006.

KIM, K. *et al.* Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model. **Neurobiology of Aging**, v. 34, n. 10, p. 2408-2420, 2013.

KUSSIA, M. *et al.* Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. **Blood Cells Mol Dis**, v. 32, n. 1, p. 52-57, jan-fev. 2004.

LARGEAULT, Anne. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 227-245, 2004.

Le BLANC, K; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cell: progress toward promise. **Cytotherapy**, v.7, n. 1, p. 36-45, mar. 2005.

LERI, A, KAJSTURA, J, ANVERSA, P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1373-1416, out. 2005.

LI Y.; FIELD P.M; RAISMAN G. Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. **Glia**, v. 52, p. 245-251, 2005.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders - time for clinical translation? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 1, p. 29-40, jan. 2010.

LIU, Z. *et al.* Cocaine- an amphetamine-regulates transcript promotes the differentiation of mouse bone marrow-derives mesenchymal stem cell into neural cells. **BioMed Central Neuroscience**, v.12, n. 67, p. 1-9, jul. 2011.

LIVESEY, F. J. Stem cell models of Alzheimer's disease and related neurological disorders. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 4, n. 6, nov. 2012.

LORENZ M.D.; KORNEGAY J.N. **Neurologia Veterinária**. 4. ed. Manole: Barueri, SP, 2006, 480p.

McLAREN, A. Stem cells: Golden opportunities with ethical baggage. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1778, jun. 2000.

MEIRELLES, L., CHAGASTELLES, P., NARDI, N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, n. 119, p. 2204-2213, jun. 2006.

MENDES, F. F. **Isquemia cerebral em cães e gatos**. Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia: Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MENDEZ-OTERO, R. *et al.* Terapias celulares em neurologia . In: MORALES, M. M. (Org.). **Terapias Avançadas - Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 55-71.

- MIN, J. *et al.* Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 125, n. 2, p. 361-369, fev. 2003.
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M.; CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Cienc. Rural**, v. 40, n. 1, Jan./Feb. 2010.
- MORALES, Marcelo. **Terapias avançadas: células-tronco, terapias gênicas e nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007, 356p.
- MULLER-SIEBURG, C; WHITLOCK, C; WEISSMAN, I. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. **Cell**, v. 44, n. 28, p. 653-662, fev. 1986.
- NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na Escola**, v. 2, n. 2, artigo 5, p. 25-29. 2007.
- NARDI, N. B.; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M. **Curso de extensão: Avanço na terapia com células-tronco na medicina veterinária**. Cellvet, Porto Alegre, mai. 2013.
- NELSON R. W.; COUTO C. G. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1994. 429p.
- NITAHARA-KASAHARA, Y. *et al.* Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 1, p. 168-177, set. 2012.
- NIXON, A. *et al.* Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 7, p. 928-937, jul. 2008.
- OHTAKI, H. *et al.* Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.
- OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. **Einstein**, v. 2, n. 4, p. 355-358, 2004.
- OSTENFELD, T. *et al.* Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 1, p. 215–226, jul. 2000.
- PACINI S. *et al.* Suspension of bone marrow–derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 12, p. 2949-2955, dez. 2007.
- PALMER, T. D. *et al.* Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. **Nature**, v. 411, n. 6833, p. 42-43, mai. 2001.
- PANTOJA, L. **Contribuição ao diagnóstico clínico da disfunção cognitiva canina**. 2010. 54p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

- PARENT J. M. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. **Neuroscientist**, v. 9, n. 4, p. 261-272, ago. 2003
- PARK, S. *et al.* Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, v. 14, n. 5, p. 584-597, mai. 2012.
- PAULA, S. *et al.* O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269, 2005.
- PAZ, A.; LUGO, A. Manejo laboratorial no cultivo de células-tronco. In: PASQUALOTTO, F. (Org.). **Células-tronco: visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007, p. 105-115.
- PETERSEN, B. E. *et al.* Hepatic oval stem cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. **Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 433-445, fev. 1998.
- PINCOLINI, D. M.; CAÑEDO, A. D. Dados parciais da meta-análise de dados do perfil de expressão gênica das células-tronco mesenquimais em mamíferos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão - UNIPAMPA**, v. 2, n. 1, 2010.
- REHEN S.; PEREIRA L. V.; MUOTRI, A. Células-tronco embrionárias. In: MORALES M. M. (Org.). **Terapias Avançadas - Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 9-23.
- RICE, C. M.; SCOLDING, N. J. Adult stem cells: reprogramming neurological repair? **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 193-199, jul. 2004.
- RIGATTI, M; BITTENCOURT, P. Causas da epilepsia tardia em uma clínica de epilepsia do estado de Santa Catarina. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 57, n. 3, p. 787-792, set. 1999.
- RITSCH, M. *et al.* Células-tronco: aspectos gerais. In: PASQUALOTTO, F. (Org.). **Células-tronco: Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007, p. 19-82.
- ROUGER, K. *et al.* Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in Duchenne muscular dystrophy dogs. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 5, p. 2501-2518, nov. 2011.
- RYU, H. *et al.* Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 4, p. 273-284, dez. 2009.
- SAKABE, T.; SAKAI, T. Musculoskeletal diseases-tendon. **British Medical Bulletin**, v. 99, n. 1, p. 211-225, jul. 2011.
- SAMPAOLESI M. *et al.* Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 574-579, nov. 2006.
- SANCHES-RAMOS P. Terapia celular en enfermedades neurodegenerativas: perspectiva desde em modelo experimental de enfermedad de Parkinson. **Neurology**. Minneapolis, US, n 18, p 355-356, 2002.

SANTOS, M. **Neoplasia causada por injeção de células mononucleares de medula óssea jovens em camundongos idosos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000771478>>. Acesso em: 15 de julho de 2013.

SATOH, H. *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. **Cell Transplantation**, v. 13, n. 4, p. 405-412, jan. 2004.

SETHE, S.; SCUTT, A. STOLZING, A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 1, p. 91-116, fev. 2006.

SHI C. *et al.* Stem cells and their applications in skin-cell therapy. **Trends Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 48-52, jan. 2006.

SILVA, G. M. F. da. **Células-tronco e Surgimento de Tumores: um estudo comparativo entre o modelo determinístico e o modelo aleatório**. Dissertação apresentada ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Modelagem Matemática e Computacional. Belo Horizonte, 2012.

SMITH, R. *et al.* Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 1, p. 99-102, jan. 2003.

SOARES, M. B.; GARCIA, S.; SANTOS, R. R. Células-tronco adultas. In: MORALES, M. M. (Org.). **Terapias Avançadas - Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 25-38.

SOARES, M.; SANTOS, R. Terapia com células-tronco: a medicina do futuro. **Revista Parcerias Estratégicas**, v. 7, n. 16, p. 153-161, out. 2002.

SOLTER, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cell and beyond: a history of embryonic stem cell research. **Nature Reviews Genetics**, v.7, p. 319-327, abr. 2006.

SOUZA, L. A. *et al.* Células-tronco mesenquimais da medula óssea associadas à matriz extracelular de colágeno no reparo de lesões tendíneas de coelhos. **Anais do X Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**. Goiânia, GO : Journal Brasileiro de Ciência Animal, 2012.

SOUZA, V. F. de *et al.* Células-Tronco: Uma Breve Revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 251-256, jul-dez. 2003.

STAMM, C. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**, v. 361, n. 9351, p. 45-46, jan. 2003.

SYRING, R. Assessment and Treatment of Central Nervous System Abnormalities in the Emergency Patient. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 35, p. 343-358, 2005.

TAGUCHI, A. *et al.* Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 3, p. 330-338, ago. 2004.

THOMSON, J. *et al.* Report: embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, nov. 1998.

TILL J.; McCULLOCH, E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cell. **Radiation Research**, v. 14, n. 2, p. 213-222, fev. 1961.

TIMM, K.; FLEGEL, T.; OECHTERING, G. Sequential magnetic resonance imaging changes after suspected global brain ischaemia in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 8, p. 408-4012, aug. 2008.

TOMIOSSO, Tatiana Carla. **Estudo da matriz extracelular do tendão calcanear após transecção parcial, com e sem inibidor de óxido nítrico sintetase**. Tese de doutorado em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

TRINDADE, A.B. *et al.*. Células-tronco e sua utilização na regeneração de nervo periférico – revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 10, n. 35, p. 1-637, 2012.

TUCHE, F. A.; DOHMANN, H. F.; CARVALHO, A. C. Terapias celulares em cardiopatias . In: MORALES, M. M. (Org.). **Terapias Avançadas - Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 39-53.

TUSZYNSKI, M. *et al.* A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. **Nature Medicine**, v. 11, n. 5, p. 551-555, mai. 2005.

UYSAL, C. A. *et al.* Células-tronco derivadas de tecido adiposo melhorar o reparo do tendão principal: avaliação biomecânica e imuno-histoquímico. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery** Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748681512003385>.

VANDEVELDE, M.; CACHIN, M. The neurological form of canine distemper. In: KIRK, R., BONAGURA, J. (Eds.). **Current Veterinary Therapy XI Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, 1992, p. 1003-1007.

VENDRAME, M. *et al.* Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. **Stroke**, v. 35, n. 10, p. 2390-2395, out. 2004.

VOLTARELLI, J. C. Perspectivas de terapia celular na esclerose lateral amiotrófica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 26, n. 3, p. 155-156, jan. 2004.

WAGERS, A.; WEISSMAN, I. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n.5, p. 639-648, mar. 2004.

WALSH, J.; ANDREWS, P. Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonic carcinoma cell line and embryonic stem cell. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 111, n. 1, p. 197-210, jan. 2003.

WANG, X. *et al.* The origin and live repopulation capacity of murine oval cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, s. 1, p. 11881-11888, set. 2003.

WEISSMAN, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. **Science**, v. 287, n 5457. p. 1442-1446, fev. 2000.

WESSMANN, A.; CHANDLER, K.; GAROSI, L. Ischaemic and haemorrhagic stroke in the dog. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 290-303, jun. 2009.

WOJAKOWSKI, W. *et al.* Mobilization of CD34⁺ CD117⁺, CXCR4⁺, c-met⁺ stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 27, n. 3, p. 283-289, fev. 2006.

YALVAC, M. *et al.* Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 33, p. 3908-3916, nov. 2009.

YANG, M. *et al.* Factors influencing the differentiation of dopaminergic traits in transplanted neural stem cell. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. (4-5), p. 851-864, out. 2003.

YAO, S.; NORTON, J.; WISE, G. Stability of cultured dental follicle cells. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 3, p. 247-254, jun. 2004.

YARAK, S; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-656, set/out. 2010.

YOUNG, R. G. *et al.* Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. **J. Orthop. Res.**, v. 16, n. 4, p. 406-413, jul. 1998.

ZAGO, M. A. Células-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 3-20.

ZHANG; Z. X.; DONG Z. H.; ROMÁN G. C. Early descriptions of Parkinson's disease in ancient China. **Arch Neurol**, v. 63, n. 5, p. 782-784, 2006.

ZHAO, L. *et al.* Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. **Experimental Neurology**, v. 174, n. 1, p. 11-20, mar. 2002.

ZUCCONI, Eder. **Isolamento e caracterização de células-tronco caninas do cordão umbilical para uso potencial em transplantes de cães distróficos**. 2009. Tese de Doutorado em Biologia (Genética), USP, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-13092009-153027/>>. Acesso em: 2013-07-13.