



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

ANDRÉA SEBELIM SESSO

**USO DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE
SERPENTE COMO ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE
LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Co-orientadora: Dra. Patrícia Rodrigue Orsi

BOTUCATU

2017

ANDRÉA SEBELIM SESSO

**USO DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DE VENENO DE SERPENTE
COMO ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon
brachyurus*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Co-orientador: Dra Patrícia Rodrigues Orsi

BOTUCATU

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sesso, Andrea Sebelim.

Uso do selante de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço tridimensional para células tronco mesenquimais da medula óssea de Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) / Andrea Sebelim Sesso. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Coorientador: Patricia Orsi

Capes: 31302017

1. Lobos. 2. Adesivo tecidual de fibrina. 3. Células da medula óssea. 4. Células-tronco. 5. Citometria de fluxo. 6. Materiais biomédicos. 7. Canídeos.

Palavras-chave: Biomaterial; Canídeos; Citometro de fluxo.

Dedicatória

Aos animais.... os estudos e a ciência que geram possibilidades e descobertas que proporcionam ferramentas que contribui para a conservação e longevidade das espécies.

Agradecimentos

Agradeço por todas as oportunidades que o universo me apresenta e por estar realizando mais um sonho nesse momento.

A minha família pela ajuda constante e por me incentivar nas minhas escolhas. Em especial minha mãe, minha melhor amiga, que nesse momento está lutando pela vida, levo comigo cada gesto, palavra, carinho e amor que sempre me proporcionou. Te amo pra sempre.

Ao meu marido Paulo por sempre me incentivar, torcer pelas minhas conquistas e por sempre estar disposto a evoluir ao meu lado.

Aos animais que me trazem aprendizados valiosíssimos e que contribuem para eu ser uma pessoa melhor a cada dia. Em especial nesse momento aos lobos-guarás, que além de me proporcionarem muitos aprendizados me trouxeram a oportunidade de executar um estudo ainda não realizado com eles, que esse estudo ajude na conservação da espécie.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior pela oportunidade, ensinamentos, confiança e ajuda constante. Você foi importantíssimo e fundamental para a realização desse estudo.

A todos professores, alunos e funcionários do CEVAP, que sempre me receberam muito bem, pela disponibilidade e ajuda em todos os momentos .

A minha co-orientadora Dra Patrícia Orsi, que me ajudou muito, por sempre estar presente e disposta a ensinar.

A todos que fazem parte da equipe do laboratório CEMIB-UNICAMP pelo acolhimento, ajuda, carinho e confiança.

A CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da FMB/UNESP pela bolsa de estudos.

Ao CEMPAS professores, residentes e funcionários, cada um de vocês trouxeram momentos únicos que irei sempre levar comigo. Agradeço muito pela oportunidade de aprendizados imensuráveis, por confiar os animais em meus cuidados, pelo carinho e atenção constante.

Aos veterinários dos zoológicos de Paulínia, Sorocaba, Americana e Nova Odessa por acreditar no projeto e disponibilizar os animais para a pesquisa.

A todos do laboratório de regeneração nervosa-UNICMP, especialmente ao Matheus e ao Prof. Alexandre L. R. Oliveira, pela receptividade e ajuda preciosa para que parte do projeto se realizasse.

A Dra Marjorie de Assis Golim – laboratório do Hemocentro - UNESP/Botucatu, agradeço imensamente a ajuda, paciência e os ensinamentos.

Este estudo foi realizado em colaboração com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia **WILDLIFE SCIENCE CENTER** (Ciência dos Animais Selvagens), Processo CNPq 465429/2014-9.



RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é encontrado em grande parte do território da América do Sul, mas 90% de seus exemplares se distribui principalmente no cerrado brasileiro, sendo o maior canídeo sul americano, e como tal, demanda grandes áreas em suas atividades. Consequentemente, ele sofre severamente os efeitos da perda de habitat pelas ações antrópicas. Isto o faz estar na lista vermelha pela União Internacional de Conservação da Natureza, como espécie ameaçada de extinção da fauna brasileira. Tendo em vista a necessidade de desenvolver estratégias para a conservação do lobo-guará, o objetivo deste projeto foi caracterizar e padronizar o isolamento, o cultivo e a criopreservação de células tronco mesenquimais derivado da medula óssea do lobo-guará, além de utilizar o selante heterólogo de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço tridimensional possibilitando procedimentos de terapia celular para a espécie. Também foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a espécie, terapia celular e selantes de fibrina. Para tanto, realizou-se a coleta de medula óssea de animais provenientes de CETAS e zoológicos; o cultivo das células tronco mesenquimais (CTMs); a caracterização a partir do uso de marcadores de superfície (CDs) por citometria de fluxo; o potencial de diferenciação das CTMs em linhagens celulares osteogênica, adipogênica e condrogênica; a análise da viabilidade celular pré e após a criopreservação; e por fim a observação e avaliação do selante de fibrina como arcabouço celular mostrando sua interação com as CTMs pela microscopia de varredura e viabilidade por microscopia confocal. A técnica empregada para coleta de medula óssea e posterior cultivo foi eficiente, sendo possível sua expansão até a sexta passagem. Os marcadores de superfície celular utilizados foram capazes de reconhecer as células possibilitando a sua caracterização por citometria de fluxo. As CTMs apresentaram potencial de diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. O processo de criopreservação foi eficaz pois manteve alta a viabilidade celular após o seu descongelamento. A interação com o selante de fibrina foi adequada e manteve as células viáveis como verificado por microscopia confocal, demonstrando a estrutura tridimensional do selante por microscopia eletrônica de varredura. A terapia celular pode proporcionar para a espécie, um tratamento alternativo e eficaz na agilidade de processos regenerativos,

minimizando o estresse em tratamentos convencionais de longa duração. O sucesso na criopreservação das CTMs torna possível a criação de um banco de células tronco que certamente ajudará na conservação da espécie.

Palavras Chaves: Biomaterial , Canídeos, Citometro de fluxo

ABSTRACT

Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) is found in South America, but 90% of its specimens are distributed mainly in the Brazilian Cerrado, being the largest South American canid, and as such, it demands large areas. Consequently, maned wolf severely undergoes the effects of habitat loss by human actions. This makes it on the red list by the International Union for Conservation of Nature, as a threatened species of extinction of Brazilian fauna. Objective of this project was to characterize and standardize the isolation, cultivation and cryopreservation of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of maned wolf. In addition to using the fibrin sealant derived from snake venom as a three-dimensional scaffold enabling cellular therapy procedures for the species. A literature review on the species, cell therapy and fibrin sealants were also carried out. For that, the bone marrow was collected from CETAS and zoological animals; culture of mesenchymal stem cells (MSCs); characterization by surface markers (CDs) using flow cytometry; differentiation potential of MSCs into osteogenic, adipogenic and chondrogenic cell lines; analysis of cell viability before and after cryopreservation; and finally, observation and evaluation of the fibrin sealant as cellular scaffold showing its interaction with the MSCs by scanning microscopy and viability by confocal microscopy. The technique used for collection of bone marrow and subsequent culture was efficient, being possible to expand until the sixth passage. Cell surface markers used were able to recognize the cells allowing their characterization by flow cytometry. MSCs presented differentiation potential in osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. Cryopreservation process was effective because it maintained high cell viability after thawing. The interaction with the fibrin sealant was adequate and kept the cells viable as verified by confocal microscopy, demonstrating their three-dimensional structure of the sealant by scanning electron microscopy. Cell therapy may provide for the species an alternative and effective treatment in the agility of regenerative processes, minimizing stress in conventional long-term treatments. Success in cryopreservation of MSCs makes it possible to create a stem cell bank that will certainly help in its conservation.

KeyWords: Biomaterial, Canids, Flow cytometer

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
Revisão de literatura	12
Objetivo	18
Referências	19
CAPÍTULO II	24
Resumo	25
Introdução	26
Metodologia	27
Resultados	31
Discussão	40
Considerações finais	43
Referências	44
Anexo I – Aprovação Comitê de ética em pesquisa – CEUA/FMB	48

Capítulo I

REVISÃO DE LITERATURA

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), conhecido também como aguará, aguaraçu, lobo-de-crina, ou lobo-vermelho é o maior de todos os canídeos sul americanos⁽¹⁾. A cor em geral é laranja-avermelhada, as orelhas são grandes com a ponta branca, a extremidade do focinho e dos longos membros são pretos com a ponta do rabo branca, os adultos pesam aproximadamente 23 Kg, com comprimento de 1,2 a 1,3 m, chegando o rabo a medir 47 cm⁽²⁾.

Segundo Sheldon, 1992⁽³⁾; Nowak e Paradiso, 1983⁽⁴⁾, o lobo-guará possui parentesco distante dos cães do Pólo-Norte porém são próximos filogeneticamente da raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) e do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). Esse canídeo se encontra entre os estados do Brasil central, sudeste e sul, ocupando campos, pantanal, cerrado e parte da caatinga. Alguns exemplares estão distribuídos no norte e nordeste da Argentina; na Bolívia; leste do Peru e norte do Uruguai⁽⁵⁾. O lobo-guará tem preferência por vegetação arbustiva com áreas de dossel aberto, sendo as áreas de fragmentos mais densas usadas para descanso durante o dia, mas também pode ser encontrado em áreas que sofrem inundações e campos cultivados pelo homem, tendo mostrado uma certa tolerância à ambientes antrópicos, por ser um animal de dieta onívora generalista e oportunista⁽⁶⁾.

Sua distribuição geográfica vem se estendendo principalmente para o sudeste do Brasil, onde as áreas até então de Mata Atlântica, se modificam, tornando-se campos de monocultura e lugares de vegetação abertas pela transformação do homem, que proporciona locais passíveis para a ocupação do lobo-guará. Mesmo sendo a espécie tolerante a algum grau de alteração antrópica, como a agricultura, esses ambientes modificados traz uma drástica redução dos ambientes ideais para a manutenção de suas populações⁽⁷⁾.

O *Chrysocyon brachyurus* é listado como ameaçado de extinção pelo governo brasileiro e em estado vulnerável pela IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza), estando na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN⁽⁸⁾.

Uma das ameaças para o lobo-guará é a destruição de seu habitat natural, com a constante urbanização, a queima anual de pastos que acabam com os cerrados^(7,9). Em estudo realizado nos cerrados foi elaborado um modelo de viabilidade populacional (VORTEX), gerado a partir de parâmetros biológicos e demográficos da espécie. Considerando as informações geradas pelo modelo e o

tempo de geração de 7 anos, foi deduzido que a espécie sofrerá uma redução populacional de pelo menos 29% nos próximos 21 anos, sendo assim afetada 3 gerações. Esta estimativa está fundamentada em uma taxa média de desmatamento do cerrado de 1% ao ano ⁽¹⁰⁾.

Além desta perda populacional estimada, a espécie também sofre perdas importantes não quantificadas decorrentes dos altos índices de atropelamentos e doenças. Outro problema a se observar é que devido seu território reduzido, são obrigados a se aproximarem de fazendas e ranchos, entrando em contato com o homem e predando animais domésticos, conseqüentemente, se tornando vulneráveis a caça ⁽¹¹⁾.

Com a grande taxa de incidentes com *Chrysocyon brachyurus*, a chegada da espécie em centros de triagens de animais silvestres (CETAS) ou em centros de reabilitação de animais silvestres vem sendo mais frequentes. Nesses centros os animais recebem tratamentos emergenciais, clínicos, cirúrgicos e usufrui de assistência até retornarem ao habitat natural, impossibilitados de tal evento são entregues a jardins zoológicos, fundações ou entidades assemelhadas, desde que fiquem sob a responsabilidade de técnicos habilitados para prosseguirem suas vidas em cativeiro ⁽¹²⁾.

Com todo esse panorama, casos de intervenção médica com esses animais estão sendo mais frequentes, mesmo a medicina de animais silvestres sendo relativamente recente, nos últimos 20 anos ela vem crescendo e ganhando esforços em estudos na conservação e pesquisas no âmbito de tratamentos e manutenção para as espécies ⁽¹³⁾.

A medicina veterinária, principalmente a medicina de animais domésticos vem evoluindo na terapêutica com a medicina regenerativa e o crescente interesse em estudos e tratamentos iniciados na medicina humana mostra as possibilidades que as células tronco oferecem nas terapias celulares, uma revolução nos mecanismos de reparo, regeneração tecidual e em terapias para diversas doenças para as quais não há tratamentos eficazes⁽¹⁴⁾. Inúmeras doenças são alvo da terapia com células tronco, tais como *diabete mellitus* tipo I ⁽¹⁵⁾, epilepsia ⁽¹⁶⁾, distrofia muscular ⁽¹⁷⁾, reparação óssea ⁽¹⁸⁾, doenças pulmonares ⁽¹⁹⁾, doença de Chagas ⁽²⁰⁾, entre outras. Assim, na medicina veterinária a terapia celular também se expande com crescente resultados como exemplo em estudos feitos com sequelas neurológicas de vírus da cinomose ⁽²¹⁾, tratamento para tendinites em equinos ⁽²²⁾, doenças cardíacas ⁽²³⁾, reparação óssea ⁽²⁴⁾, aplasia medular ⁽²⁵⁾.

As células tronco são células com capacidade de auto-replicação, isto é, com capacidade de gerar uma cópia idêntica a si mesma e com potencial de diferenciação em vários tecidos ⁽²⁶⁾. Desta forma, as células tronco presentes nos diferentes tecidos tem papel regenerativo quando estes sofrem injúrias, estão amplamente distribuídas pelo organismo e a classificação é dada de acordo com o tecido de origem, assim como por seu potencial de diferenciação em um ou mais tipos específicos de células maduras ⁽²⁷⁾. Havendo como exemplo de células tronco a mórula totipotente, células tronco embrionárias pluripotentes, células tronco hematopoiéticas e células tronco mesenquimais multipotentes ⁽²⁸⁾.

As células tronco mesenquimais multipotentes (CTMs) são consideradas uma linhagem de células tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos ⁽²⁹⁾.

Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm⁽³⁰⁾. Contudo, as CTMs apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos, sendo a caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos. Essa imunofenotipagem é realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem esses antígenos de superfície da membrana celular, conforme demonstrado em estudos contemporâneos ⁽³¹⁾. A população de CTMs isoladas da medula óssea de humanos e camundongos expressa em sua superfície marcadores moleculares como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA- β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1) ⁽³²⁾.

Paralelamente, existe um consenso na literatura de que as CTMs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mieloides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoiéticas). A ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas. Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de CTMs, a *International Society for Cellular Therapy* concorda que apenas a

identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoiéticos, é suficiente para a imunofenotipagem dessas células. Contudo, essa caracterização deve sempre estar acompanhada da demonstração da aderência celular por longos períodos em cultura e da diferenciação destas em pelo menos duas linhagens celulares distintas ^(33, 34).

Com todo potencial terapêutico das CTMs, a utilização de um arcabouço apropriado, associado às CTMs, é de grande importância pois proporciona a facilidade da adesão das células no local desejado, crescimento, proliferação, diferenciação, formação do tecido e sua reorganização ⁽³⁵⁾. Os materiais utilizados como arcabouços podem ser biológicos ou sintéticos, o primeiro grupo inclui, geralmente, proteínas e polissacarídeos como colágeno, fibrina, alginato, ácido hialurônico, entre outros, enquanto que o segundo grupo é formado por materiais cerâmicos, metálicos ou poliméricos, tais como o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido polilático (PLA). Todos eles tem sido utilizados para fabricar arcabouços na engenharia de tecidos porém devem ser biocompatíveis e atóxicos, não devendo apresentar rejeição do organismo receptor, permitir adesão e crescimento das células transplantadas por sua estrutura, atender as necessidades biológicas e nutricionais do cultivo celular associado a ele e ser mecanicamente adequado ao sítio de inclusão objetivando a reestruturação do tecido lesado ⁽³⁶⁾.

O selante de fibrina (SF) é usado em cirurgias vasculares como enxertos, sendo vantajoso em pacientes com problemas de coagulação evitando perdas de sangue intensas em cirurgias ⁽³⁷⁾. O mecanismo de ação dos selantes de fibrina imitam os últimos passos da cascata de coagulação, com a formação definitiva de um coágulo de fibrina ⁽³⁸⁾. Quando a trombina é formada, o fibrinogênio é transformado em fibrina, que é o primeiro passo de cura de uma ferida porém, além da hemostasia que o SF proporciona, a fibrina produz uma matriz que adere outras células como as endoteliais e fibroblastos que levam a angiogênese e a remodelação tecidual. Portanto o SF pode servir como arcabouço apropriado, pois já foi demonstrado que ele também promovem a migração das CTMs sobre sua estrutura altamente reticulada, além de permitir a proliferação celular sem ocorrer a deformação estrutural ⁽³⁹⁾.

Esse biomaterial em associação com as CTMs, já foram estudadas, com bons resultados ^(40,41). Várias fórmulas já foram desenvolvidas e suas diferenças vão desde a origem da fonte de fibrinogênio e de trombina até na diferença de

concentração de diversos componentes ⁽⁴²⁾.

Neste sentido, visando substituir os componentes oriundos de sangue humano na composição dos selantes de fibrina comerciais, o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) - (UNESP/Botucatu), apresentou em 1989 um selante de fibrina, no qual a trombina bovina foi substituída por uma enzima trombina-símile derivada de peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) ao invés de trombina bovina ⁽⁴³⁾. Thomazini-Santos et al. (1998) ⁽⁴⁴⁾ realizaram estudo comparativo entre crioprecipitados bovinos, equinos, ovinos e bubalinos, que indicou que bubalinos apresentam maior nível de fibrinogênio quando comparado aos outros, sendo este utilizado na confecção do produto, após essa pesquisa foi substituído do fibrinogênio humano.

A aplicabilidade do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (SFPS) foi amplamente avaliada em animais de experimentação e ensaios clínicos, com aplicações em pele ⁽⁴⁵⁾ intestino ⁽⁴⁶⁾, testículo ⁽⁴⁷⁾, útero ⁽⁴⁸⁾, tendão ⁽⁴⁹⁾, e outros tecidos. Os resultados indicam que o selante de fibrina derivado de peçonha de serpente é aplicável por produzir uma maior recuperação tecidual, aumentar a sobrevida de enxertos autógenos de pele de espessura parcial, reduzir o acompanhamento pós-operatório, diminuir o edema na fase exudativa, facilitar a evolução da fase proliferativa e de maturação da cicatrização e acelerar o processo de cicatrização ⁽⁵⁰⁾

Gasparotto *et. al.* (2014), avaliaram o crescimento e a viabilidade celular *in vitro* de CTMs derivadas da medula óssea de ratos, em associação ao biomaterial SFPS e mostrou que as CTMs foram capazes de se diferenciarem para o padrão celular osteogênico, adipogênico e condrogênico. Assim o selante permitiu a diferenciação celular podendo atuar como um ótimo arcabouço biológico. O biomaterial promoveu a captura e permitiu o crescimento das CTMs que se aderiram em sua superfície e o SFPS em contato as CTMs sustentou a sobrevivências das mesmas, comprovando assim a viabilidade celular junto ao biomaterial ⁽⁵¹⁾.

Desde então, diversos estudos vem sendo conduzidos com sucesso na reconstrução tecidual de nervos, ossos, pele, dentes, etc, utilizando a estrutura tridimensional deste selante de fibrina como *scaffold* para células tronco ^(52,53,54,55,56).

Considerando que o uso deste selante possa ser aplicado como arcabouço biológico para as CTMs, podemos assim criar uma alternativa terapêutica extremamente eficiente na preservação do lobo-guará que está ameaçado de extinção. Uma vez aplicado o selante de fibrina enriquecido com CTMs em um

determinado tecido, temos a possibilidade de regeneração e diferenciação celular local.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Os objetivos gerais deste estudo foram: padronizar a obtenção de células tronco mesenquimais de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*); otimizar a sua criopreservação; e utilizar o selante de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço em procedimentos de terapia celular.

Objetivos Específicos

- Coletar, isolar e cultivar as células tronco mesenquimais de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*);
- Analisar a viabilidade celular pré e pós criopreservação;
- Caracterizar as células tronco mesenquimais a partir do uso de marcadores de superfície (CDs) por citometria de fluxo;
- Verificar o potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais em linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica;
- Estudar a adesão do selante heterólogo de fibrina como arcabouço celular pela análise de viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

1. Dietz JM. Ecology and social organization of the maned wolf. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 1984, 392:1-51.
2. Dietz, JM. Mammalian Species – *Chrysocyon brachyurus*. *The American Society of Mammalogists*. 1985;234:1-4.
3. Sheldon JW. *Wild Dogs: The Natural History of the Nondomestic Canidae*, Academic Press Inc: San Diego, California, 1992; 69-75.
4. Nowak RM, Paradiso JL. *Walker's Mammals of the World*. 4.ed. The Johns Hopkins University Press, 1993;957-958
- 5- Carvalho, CT . Aspectos Faunísticos do Cerrado – O Lobo-guará (Mammalia, Canidae). *Boletim Técnico (Instituto Florestal, São Paulo)*, 1976;21 : 1-16.
- 6.Veado, BV & Pereira, VS. Alguns Aspectos Reprodutivos do - Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Canidae) em Cativo. - *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 1995;19 (1-2) : 141 – 151.
7. Fonseca, GAB, Rylands AB, Costa CMR, Machado RB, Leite YLR. *Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1994.
8. Margarido TCM, Braga FG. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná*, Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2004;764
- 9.Sano, SM. & Almeida, SP. *Cerrado ambiente e flora*. Brasília, EMBRAPA, 1998;556 p.
10. Paula, RC, Rodrigues FHG, Queirolo D, Jorge RPS, Lemos FG, Rodrigues LA. Avaliação do estado de conservação do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. Instituto Chico Mendes da conservação da biodiversidade (ICMbio). - *Biodiversidade brasileira*, 2013;3:146-159
11. Paula, RC, Médici P, Morato RG. *Plano de ação para a conservação do Loboguará: análise de viabilidade populacional e de habitat*. Brasília: IBAMA. 2008; 1:158
12. Cubas ZS, Silva JCR, Dias JLC. *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Ed Roca. 2014; 2 (1):1237p
13. Cubas, ZS.; Silva JCR, Dias JLC. *Tratado de animais selvagens*. São Paulo Ed Roca, 2007; 1(1):983 p
14. Schwindt, TT, Barnabé, GF, Mello LEAM. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, 2005;1:13-19
15. Voltarelli, JC. Transplante de células-tronco hematopoéticas no diabetes melito do tipo I *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2004;26:43-45

16. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000;290: 1775–1779
17. Zucconi E, Vieira NM, Bueno, DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, Passos BMR, Miglino MA, Zatz M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*, 2010;19:395-402
18. Olssoni CD, Pippi LN, Tognoli, GK, Raiser AG. Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. *Ciência Rural*, 2008;8: 2403-2412.
19. Paes JTR, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz, MA, Moraes, LBC, Faria CA, Stessuk T. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2009; 140-148
20. Santos RR, Soares MBP, Carvalho ACC. Transplante de células da medula óssea na tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2004;.37:490-495
21. Brito, HFV, Corat, MAF, Santos MR, Gilioli R, Passos LAC, Lancelloti M, Ferreira F, LI LM. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. *Medvop*, 2010;8:26-29.
22. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair, *Journal of Orthopaedic Research*, 2008, 16(4):406-413.
23. Kazemi D, Shams Asenjan K, Dehdilani N, Parsa H. Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin. Macroscopic and histological assessments. Department of Veterinary Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, 2017; 6:2
24. Mathieu, DVM, Bartunek, BMD, Oumeiri E, Touihri MDK, Hadad MDI, Thoma MSP, Thierry MS, Costa DVM, Egrise MD. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of non modified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2009;138.
25. Moraes, LF and Takahira RK. Aplastic bone marrow in dogs. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 2010;(9):99-108
26. Xiao Q, Wang SK, Tian H, Xin L, Zou ZG, Hu YL, Chang CM, Wang XY, Yin QS, Zhang XH, Wang LY. TNF- α increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62(3):409
27. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Current Biotechnol.* 2005; 16(5): 498-502.

- 28.** Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38(4):23-33.
- 29.** Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 2006;119:2204-2213.
- 30.** Gronthos S, Zannettino, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*, 2003;16:1827-1835
- 31.** Luo G, Gu F, Zhang Y, Liu T, Guo P, Huang Y. Icariside II promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in beagle canine. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):4367-4377.
- 32.** Horwitz EM, Le B, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005;7:393-395
- 33.** Wu X, Ren J, Li J. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2012;14: 555-62.
- 34.** Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2003; 31: 27-33.
- 35.** De Oliveira G, Barbosa J, Buchaim DV, De Souza B, Cleuber RP, Torres K, Barraviera B, Ferreira RS, Andreo JC, De Castro RA, Cestari TM, Buchaim RL . Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 2016;162: 663-668.
- 36.** Gaßling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Jorg W. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* . 2009;108(1):48–55.
- 37.** Barros LC , Ferreira RS , Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A New Fibrin Sealant From *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2009;12:8, 553-571
- 38.** Sierra DH. Fibrin Sealant Adhesive Systems: A review of their chemistry, material properties and clinical applications. *Journal of biomaterials applications*, 1993; 7(4): 309-352
- 39.** Catelas I, Sese N, Wu MB, Dunn JCY, Helgerson S, Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrina gles in vitro. *Tissue Engineering*. 2006;12(8):2385-2396

- 40.** Ryu JH, Kim IK, Cho SW, Cho MC, Hwang KK, Piao H, Piao S, Lim SH, Hong YS, Choi CY, Jong K. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials*. 2005;26:319-26.
- 41.** Ferreira RS, Barros RF, Curtolo LA, Fernandes LP, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, De Pontes LG, Dos Santos LD, Barraviera B. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside - an overview. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2017; 23: 1.
- 42.** Valbonesi M. Fibrin glues of human origin. *Best practice & research. Clin Haemat*. 2006; 19(1): 191-203.
- 43.** Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates. *J Venom Anim Toxins*. 1998; 4: 120-36.
- 44.** Barros LC, Ferreira JR, RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E. A New Fibrin Sealant from *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine. *J Toxicol Environ Health*. 2009; 12(8): 553-71.
- 45.** Leite, CVS, Naresse LE, Arantes HL, Lopes AF, Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Mercadante MC, Barraviera B, Kobayasi S. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. *J Venom Anim Toxins*. 2000; 6: 180-93.
- 46.** Sartori R, Prestes NC, Canavessi AMO, Curi PR, Bergfelt DR. Testicular biopsy with tru-cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. *Small Rum Res*. 2002; 45: 25-31.
- 47.** Moraes JRE, Correia PHA, Camplesi AC, Moraes FR. Experimental use of fibrin glue derived from snake venom in non-pregnant canine uterus. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2004; 10(2): 133-43.
- 48.** Ferraro GC, Moraes JRE, Pereira GT, Moraes FR, Camargo MHB. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. *J Anim Toxin incl Trop Dis*. 2005; 11(4): 433-46
- 49.** Sampaio RL, Ranzani JJt, Brandão CVS, Thomazini-Santos IA, Barraviera B, Barraviera SRCS, Giannini MJSM. Use of fibrin glue derived from snake venom in the repair of deep corneal ulcers – experimental study in dogs. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007; 13(4): 857-73.
- 50.** Gatti MAN, Vieira LM, Barraviera B, Barraviera SRCS. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011; 17(2): 226-9.
- 51.** Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira AL, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, Ferreira Jr RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):78-88.

- 52.** Biscola NP, Cartarozzi LP, Ulian-benitez, S, Barbizan R, Castro, MV, Spejo AB, Ferreira RS, Barraviera B, Oliveira ALR. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 2017; 23: 13p.
- 53.** Araújo MR, Kyrylenko S, Spejo AB ; De castro MV, Ferreira RS, Barraviera B, De oliveira, ALR. Transgenic human embryonic stem cells overexpressing FGF2 stimulate neuroprotection following spinal cord ventral root avulsion. *Experimental neurology*, 2017; 294: 45-57p
- 54.** Buchaim DV, Rodrigues ADC, Buchaim RL, Barraviera B, Ferreira RS, Junior GMR, Bueno CRDS, Roque DD, Dias DV, Dare LR, Andreo JC. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLTL) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers in Medical Science*, 2016; 25:1-8 .
- 55.** Perussi BN, Politti CL, Ferreira RS, Barraviera B, Leite RDOA . Long-standing motor and sensory recovery following acute fibrin sealant based neonatal sciatic nerve repair. *Neural Plasticity*, 2016;2016:1-19
- 56.** Castro MV, Barbizan R, Ferreira RS, Barraviera B, Oliveira ALR. Direct spinal ventral root repair following avulsion: Effectiveness of a new heterologous fibrin sealant on motoneuron survival and regeneration. *Neural Plasticity*, 2016;1-16.

Capítulo II

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE LOBO-GUARÁ (*CHRYSOCYON BRACHYURUS*) E SUA ADESÃO COM UM SCAFFOLD DE FIBRINA

RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é o maior canídeo sul americano e encontra-se ameaçado de extinção. A terapia celular pode diminuir o tempo de tratamento em cativeiro minimizando o estresse destes animais. Pela primeira vez foi realizada o cultivo e caracterização de células tronco mesenquimais (CTMs) provenientes de medula óssea de Lobo-Guará, com expansão até a sexta passagem. A manutenção da viabilidade celular após a criopreservação foi avaliada por citometria de fluxo e revelou uma perda de apenas 17,5% das células. Os marcadores de superfície celular positivos, CD90 e CD44, e negativos MHCII, CD11b e CD34 foram eficientes para a caracterização das CTMs. As células apresentaram potencial de diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. O selante heterólogo de fibrina utilizado como arcabouço tridimensional comprovou sua interação com as CTMs pela microscopia de varredura e manteve as células viáveis quando estas foram marcadas e visualizadas por microscópio confocal. A terapia celular pode proporcionar para a espécie um tratamento alternativo e eficaz acelerando processos regenerativos, minimizando o estresse em tratamentos convencionais de longa duração. O sucesso na criopreservação das CTMs torna possível a criação de um banco de células tronco, que certamente ajudará na conservação do lobo-guará.

Palavras Chaves: Biomaterial, Canídeos, Citometro de Fluxo

INTRODUÇÃO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é o maior de todos os canídeos Sul Americanos, pesando 23 Kg e medindo 1,3 metros de comprimento com distribuição no centro-sul do Brasil; no norte e nordeste da Argentina; norte do Uruguai; na Bolívia; e no leste do Peru^(1,2). A espécie é listada como ameaçada de extinção pelo governo brasileiro e em estado vulnerável pela IUCN, (União Internacional para Conservação da Natureza) ocupa a lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN^(3,4).

A terapia celular vem sendo utilizada com sucesso na medicina veterinária em animais domésticos (cães, gatos e equinos) para tratamentos emergenciais, clínicos e cirúrgicos como cinomose⁽⁵⁾, tendinites⁽⁶⁾, doenças cardíacas⁽⁷⁾, reparação óssea⁽⁸⁾, aplasia medular⁽⁹⁾, sendo que a terapia celular ainda não é utilizada ou estabelecida em animais selvagens. As células tronco mesenquimais são células progenitoras pluripotentes não hematopoiéticas capazes de se diferenciarem em várias linhagens, incluindo osso e cartilagem⁽¹⁰⁾.

Com todo potencial terapêutico identificado das CTMs, a utilização de um arcabouço apropriado, é de grande importância pois proporciona e facilita o manejo e a adesão das células no local desejado, seu crescimento, proliferação, diferenciação, reconstrução tecidual e sua reorganização⁽¹¹⁾. Selantes de fibrina são arcabouços biológicos tridimensionais amplamente utilizados em associação com as CTMs para reconstrução óssea, cartilagem, tendão, ligamentos, cirurgias cardíacas, regeneração nervosa, queimaduras e feridas cutâneas crônicas, com bons resultados^(12,13,14,15). O Selante Heterólogo de Fibrina derivado de veneno de serpente tem sido amplamente utilizado com sucesso em terapias celulares e regenerativas pois estimula a angiogênese local, além de preservar e proteger as CTMs^(16,17,18,19,20).

Nosso estudo avaliou a biocompatibilidade *in vitro* de um Selante Heterólogo de Fibrina como *scaffold* 3D evidenciando a interação com as CTMs de lobo-guará permitindo assim criar uma alternativa terapêutica extremamente eficiente na preservação desta espécie. Para tanto, delineou-se um protocolo de manejo, coleta e cultivo destas células que se expandiram até a sexta passagem, mostrando positividade em marcadores de superfície celular (CDs) de cães.

Evidenciou-se a efetividade nas CTMs em se diferenciarem em multilinhagens e com altas taxas de viabilidade celular antes e após a sua criopreservação. A associação com o Selante Heterólogo de Fibrina mostrou-se eficaz pela interação e viabilidade das CTMs visualizadas por microscopia de varredura e confocal.

Metodologia

Selante de fibrina

Os selantes de fibrina comercialmente disponíveis consistem em trombina humana e fibrinogênio, que podem transmitir doenças infecciosas ⁽¹²⁾. Pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Venenosos da UNESP (Universidade Estadual de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP), propuseram um novo selante produzido a partir da enzima tipo trombina extraída de veneno de serpente e fibrinogênio animal. O selante foi produzido neste estudo de acordo com a padronização proposta ⁽²⁰⁾. O produto foi fornecido em três frascos que foram armazenados a -20 °C. Após o uso, os componentes foram misturados nas proporções previamente estabelecidas para gerar um coágulo estável com uma rede de fibrina densa ⁽¹¹⁾.

Isolamento e cultivo das CTMs

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, e está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob o número 1143/2015 e SISBIO sob o número 6342608.

As CTMs foram isoladas a partir da medula óssea. Para sua coleta, quatro lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) foram anestesiados com quetamina 10mg/kg IM e midazolam 0,5mg/Kg IM. Após sedação foram entubados e mantidos em anestesia inalatória com isoflurano a 3% e monitorados. Com o animal posicionado em decúbito lateral foi feita a tricotomia na região do osso ilíaco e realizado a assepsia.

Foi introduzido uma agulha hipodérmica 40/16 próximo ao tubérculo da crista ilíaca até atingir o canal medular. Então acoplou-se uma seringa de 20ml contendo 1ml de heparina e aspirado de 10 a 15ml de medula óssea de cada animal.

Após a coleta da medula óssea, o material obtido foi diluído na proporção 1:1 em meio DMEM alta glicose (Gibco, Grand Island, NY, USA) e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. Retirado o sobrenadante, a medula foi colocada em gradiente de Ficoll (densidade 1,077g/mL) na proporção de 2:1 e centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm. O anel mononuclear formado foi retirado e ressuspendido em DMEM alta glicose e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O *pellet* obtido foi homogeneizado com DMEM alta glicose, suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100µL de solução de penicilina/estreptomicina (Laboratório Gibco) e 3 µL anfotericina B (Gibco, Grand Island, NY, USA). A seguir, a amostra foi cultivada em garrafas de 25cm² e acondicionadas em estufa de CO₂.

Citometria de fluxo

Foram utilizados os seguintes marcadores de superfície celular **CD44** (AbD Serotec, Policlonal (rato, cão). Ref: MAC1041A488, Clone: YKIX337.8.7, Hercules, California, USA); **CD34** (AbD serotec, Monoclonal (cão). Ref: MCA2411F, Clone:1H6, Hercules, California, USA); **MHCII** (AbD serotec, Policlonal (rato, cão). Ref: MCA1044F, Clone: YKIX334.2, Hercules, California, USA); **CD90** (eBioscience, Monoclonal (cão). Ref: 17-5900-42, Clone: YKIX337.217, Waltham, Massachusetts, USA) e **CD11B** (Abcam, Policlonal. Ref: ab25533, clone: M1/70, Eugene, Oregon, USA). Foram adquiridos um mínimo de 10.000 eventos para cada amostra, analisados no citômetro de fluxo FACS - CaliburTM (Becton-Dickinson, USA) usando o software Cell Quest Pro (Becton-Dickinson). Os dados foram exportados e analisados com o software FCS Express 2 (De Novo-Software).

O evento de população celular (Gate) foi configurado no gráfico de luz dispersa para a frente (FSC) versus luz lateral dispersa (SSC) para definir e caracterizar o tamanho e a granularidade de cada população de células. Em seguida, as células foram plotadas em um histograma de duas cores para detectar células coradas positivamente por uma mudança da parte inferior esquerda para a inferior direita. A porcentagem de células na parte inferior direita foi delineada para cada origem das células com várias repetições.

Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular foram utilizados os marcadores anexina V Alexa Fluor® 488 (Life Technologies - REF A13201, Eugene, Oregon, USA) que marca células apoptóticas e o iodeto de propídio (Life Technologies – REF P1304MP, Eugene, Oregon, USA) que marca células tardiamente apoptóticas ou necróticas.

Foram preparadas três amostras contendo 1×10^6 de células cada que foram diluídas em PBS a 1% e centrifugadas em 7 minutos a 1500rpm. Outras três amostras foram também avaliadas após a sua criopreservação.

Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 100 µL de tampão de anexina e diluído 5 µL de anexina V, Alexa Fluor® 488 (life technologies - REF A13201) e 0,25 µL de iodeto de propídio (life technologies – REF: P1304MP). As amostras foram incubadas por 15 minutos sem a presença de luz. Foi adicionado em cada ensaio 400 µL de tampão de anexina, homogeneizado e feito a leitura no citometro de fluxo.

Diferenciação celular

As CTMs têm capacidade de se diferenciarem em tecidos de linhagens distintas, portanto foram utilizados os Kits de diferenciação da StemPro de Adipogênese, Condrogênese e Osteogênese (Kits do laboratório Invitrogen Life Science Technologies - Carlsbad, California, EUA) para diferenciar as CTMs de *Chrysocyon brachyurus* em tecidos adipogênicos, condrogênicos e osteogênicos, de acordo com as instruções do fabricante.

Diferenciação na linhagem adipogênica

Quando a cultura celular atingiu mais de 70% de confluência, o meio de cultura completo foi substituído por um meio de diferenciação específico que continha 90% de Metais Basais de Diferenciação de Adipócitos (Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, California, EUA), 10% de Suplemento de Adipogênese (Invitrogen Life Science Technologies Carlsbad, California, EUA), 100 UI / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomicina e 3 µg / ml de anfotericina B (Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, California, EUA). O meio de diferenciação foi substituído a cada 3 dias durante um período de 21 dias de diferenciação. Após este procedimento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 10%, lavadas em PBS e água destilada e depois coradas com 2 ml de solução de oil Red (Sigma® cod 0625-256, St.Louis, Missouri, USA).

As células foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente, o corante foi posteriormente removido e as células foram lavadas três vezes em água destilada. Um ml de solução de hematoxilina foram adicionados às células durante 1 minutos para rotular os núcleos. Os poços foram lavados novamente com água destilada e os campos foram observados sob um microscópio de luz invertido.

Diferenciação na linhagem osteogênica

Quando a cultura celular atingiu mais de 70% de confluência, o meio de cultura completo foi substituído por um meio de diferenciação específico que continha 90% do Kit StemPro Osteócito/Meio basal de diferenciação de condrócitos, 10% de Suplemento de Condrogênese StemPro, 100 µg de penicilina, 100 µg de Estreptomicina e 3 µg / ml de anfotericina B (Laboratorio Gibco, Grand Island, NY,USA). O meio de diferenciação foi substituído a cada 3 dias durante um total de 15 dias de diferenciação. Após este procedimento, as células foram fixadas em etanol a 70% em geladeira, lavadas em água destilada e coradas com Alizarin Red (Sigma® cod 5533-256, St.Louis, Missouri, USA) por 2 minutos. As células foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente, após o corante foi removido, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e os campos foram observados sob um microscópio de luz invertido.

Diferenciação na linhagem condrogênica

Quando a cultura celular atingiu mais de 70% de confluência, o meio de cultura completo foi substituído por um meio de diferenciação específico que continha 90% de Metais basais de diferenciação de osteócitos / condrócitos StemPro (Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, California,USA), 10% de Suplemento de Chondrogênese StemPro (Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, California,USA), 100 UI / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomicina e 3 µg / ml de anfotericina B (Laboratorio Gibco, Grand Island, NY,USA). O meio de diferenciação foi substituído a cada 3 dias totalizando 21 dias. Após este procedimento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, e coradas com Alcian Blue, Hematoxilina e Azul de Toluidina e feito cortes histológicos. As laminaas foram visualizadas em microscópio invertido.

Microscopia eletrônica

Foram preparadas 4 amostras, duas com células mesenquimais para controle e duas com selante de fibrina + células mesenquimais incubadas por 2 minutos antes do processamento. As amostras foram processadas nas etapas que seguem: Lavagem com tampão fosfato de sódio PH 7,38, com duas trocas de 5 minutos cada. Após foi realizado a fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio PH 7,38 durante 1 hora. Lavagem com fosfato de sódio PH 7,38% com 3 trocas de 5 minutos cada. Após, foi feito a fixação com tetróxido de ósmio 0,1M Ph 7,4 durante 1 hora. Ao término foi feita a lavagem com fosfato de sódio pH 7,4 com 2 trocas de 5 minutos cada. Após as lavagens se fez o processo de desidratação com etanol 30% por 5 minutos, etanol 50% por 5 minutos e etanol 70%, nessa etapa a placa foi para geladeira. No dia seguinte (24hs) seguiu a etapa de desidratação com etanol 90% por 5 minutos, etanol 100% por 5 minutos por 3 vezes. Com o término do preparo das amostras as lamínulas foram para a etapa do ponto crítico no aparelho Critical Point Dryer modelo SPD 030 (Balzers, Lichtenstein, Austria) que consiste na secagem pelo ponto crítico em CO₂. Após, as lamínulas foram montadas em suportes de alumínio (stubs) com fita condutora de alumínio e levadas para o aparelho Sputter Coater modelo SCD 050 (Balzers, Lichtenstein, Austria) para receber cobertura de ouro. Com as amostras prontas foi realizada as fotos no microscópio de varredura JFM 5800 LV (Japão).

Microscopia confocal

As amostras foram analisadas no microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 da Leica (Alemanha). Para excitação do corante nuclear Hoeschst 33342 foi usado o laser 405 e para a excitação da gioxina foi usado o laser 633. O software para gerar as análises foi o LAS AF.

O selante de fibrina foi marcado utilizando o com Alexa fluor 647 (life technologies REF – A30009, Eugene, Oregon, USA) de acordo com o fabricante. O marcador foi adicionado ao componente 1 do Selante de Fibrina para a marcação da proteína Trombina-like que tem massa molecular de aproximadamente 29 Kda. Após a sua marcação, este componente marcado foi misturado aos demais componentes do Selante para a formação da rede de fibrina.

Para a marcação das células mesenquimais foi usado o marcador Hoeschst 33342, trihydrochloride, trihydrate (life technologies REF - H1399, Eugene, Oregon, USA) de acordo com o fabricante.

RESULTADOS

Expansão e caracterização das células tronco mesenquimais (CTMs)

As CTMs de *Chrysocyon brachyurus* foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular e se confirmou aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide. Em 8 dias demonstrou confluência de 50% analisado em microscópio óptico. A primeira passagem foi feita após 15 dias do cultivo primário. As células foram expandidas até chegarem na sexta passagem. Da primeira até a sexta passagem se deram intervalos de aproximadamente 5 dias (Figura 1).

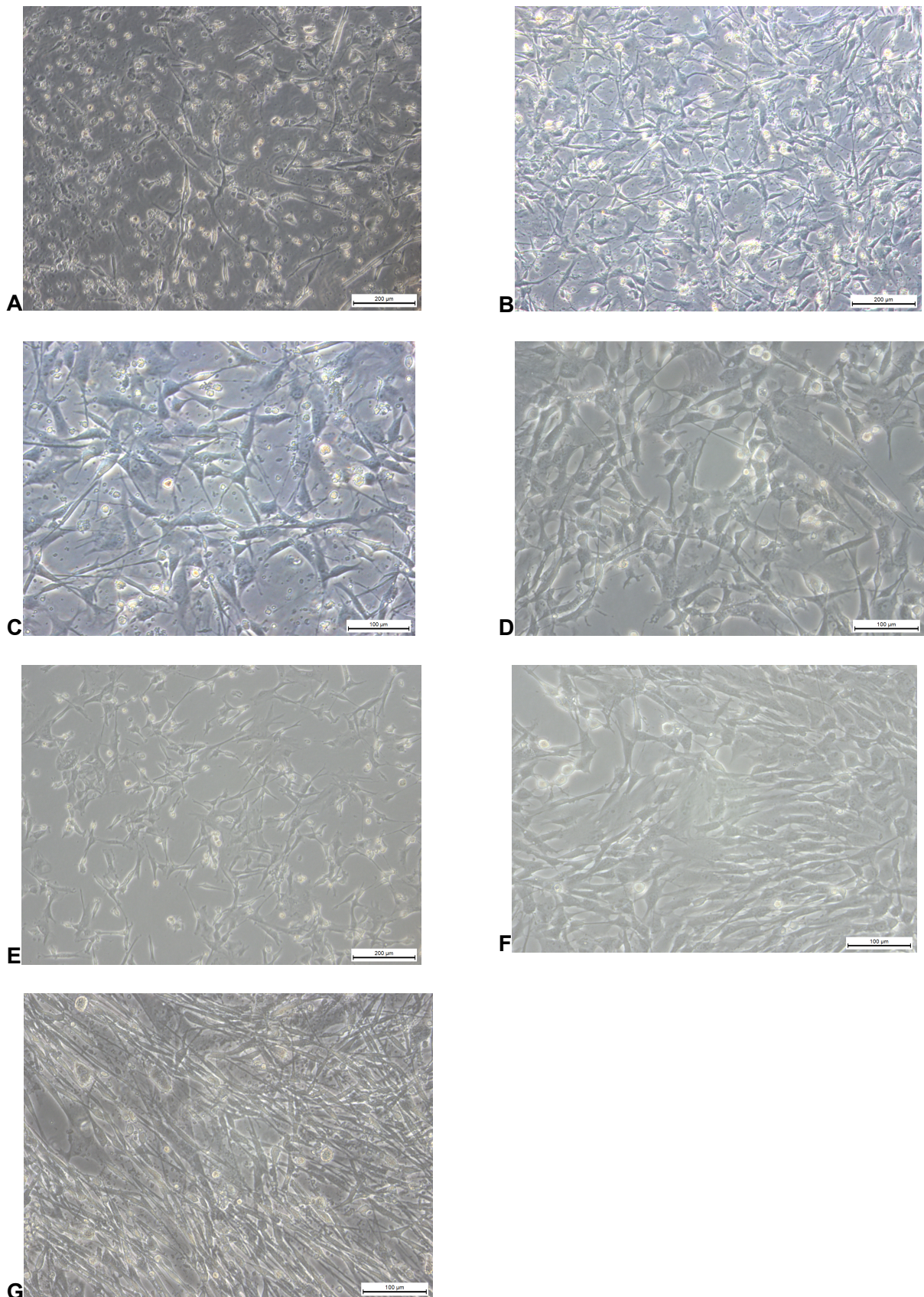


Figura 1. Morfologia de células mesenquimais de lobo-guará em cultivo. **(A)** Cultivo primário. **(B)** CTMs 1^a passagem. **(C)** CTMs 2^a passagem. **(D)** CTMs 3^a passagem. **(E)** CTMs 4^a passagem. **(F)** CTMs 5^a passagem. **(G)** CTMs 6^a passagem.

As CTMs isoladas foram avaliadas por citometria de fluxo e apresentaram expressão para os marcadores positivos CD90 (91,45%) e CD44 (26,53%) e negativos MHCII (6,37%), CD34 (2,71%) e CD11b (2,93%) como mostra a Figura 2.

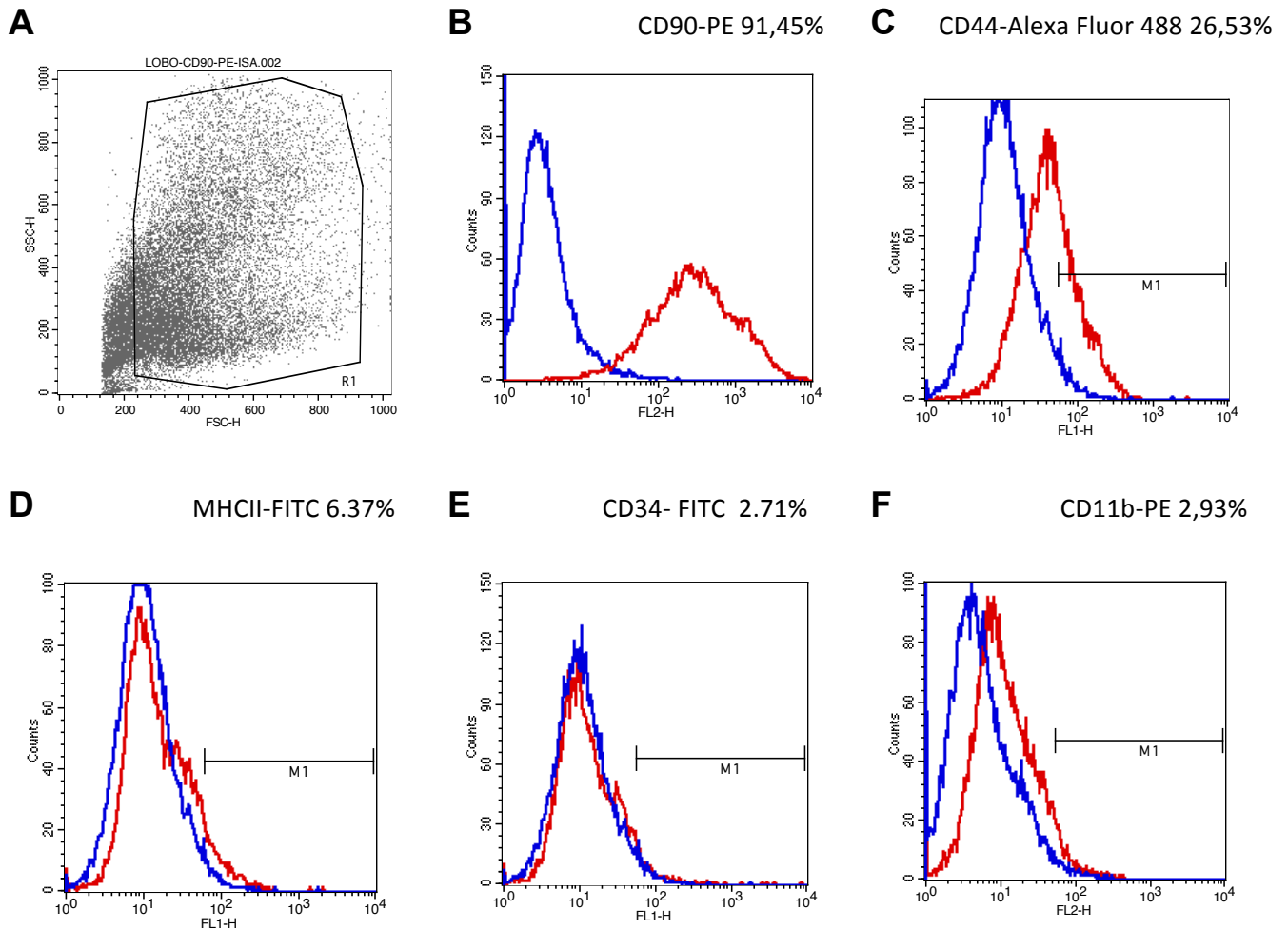


Figura 2. Fenotipagem mesenquimal revelada pela citometria de fluxo. **(A)** Gate: local delimitado com maior homogeneidade de células mesenquimais de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) para marcação. Resultados mostram a porcentagem (%) e a reatividade dos marcadores na citometria de fluxo. Curvas em azul: controle. Curvas em vermelho: células marcadas. Marcadores positivos CTMs: **(B)** CD90 e **(C)** CD44. Marcadores negativos CTMs: **(D)** MHCII, **(E)** CD34 e **(F)** CD11b.

Devido ao fato de não haver marcadores celulares específicos para a espécie, testes preliminares foram realizados com o marcador CD11b (23,31%) no sangue periférico (Figura 3). Também foram realizados os mesmos testes controle no anel celular mononuclear para os marcadores CD90 (65,78%), CD34 (7,07%), CD11b (0,68%) e MHCII (14,08%) como mostra a Figura 4.

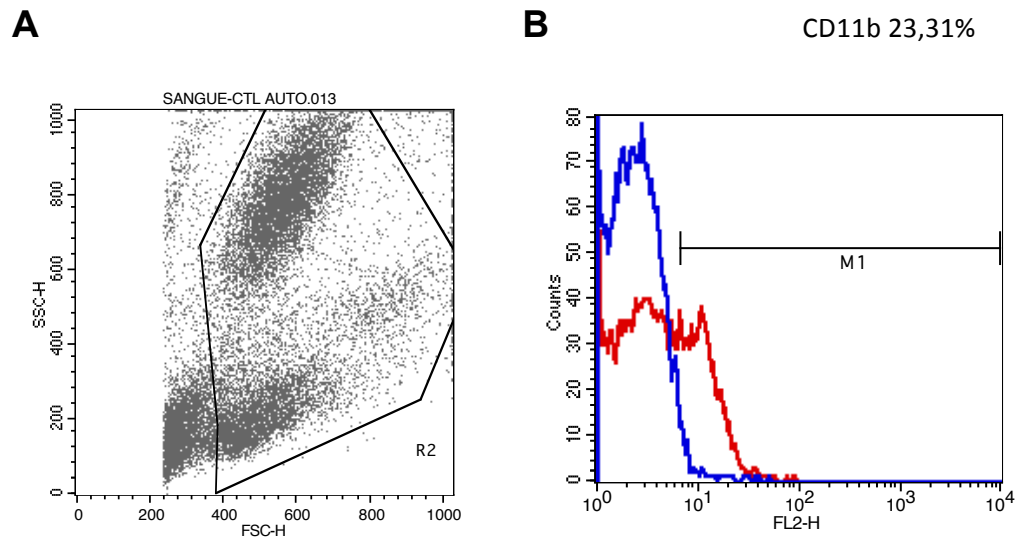


Figura 3. Fenotipagem de células de sangue periférico de lobo-guará revelada pela citometria de fluxo. **(A)** Gate; **(B)** CD11b.

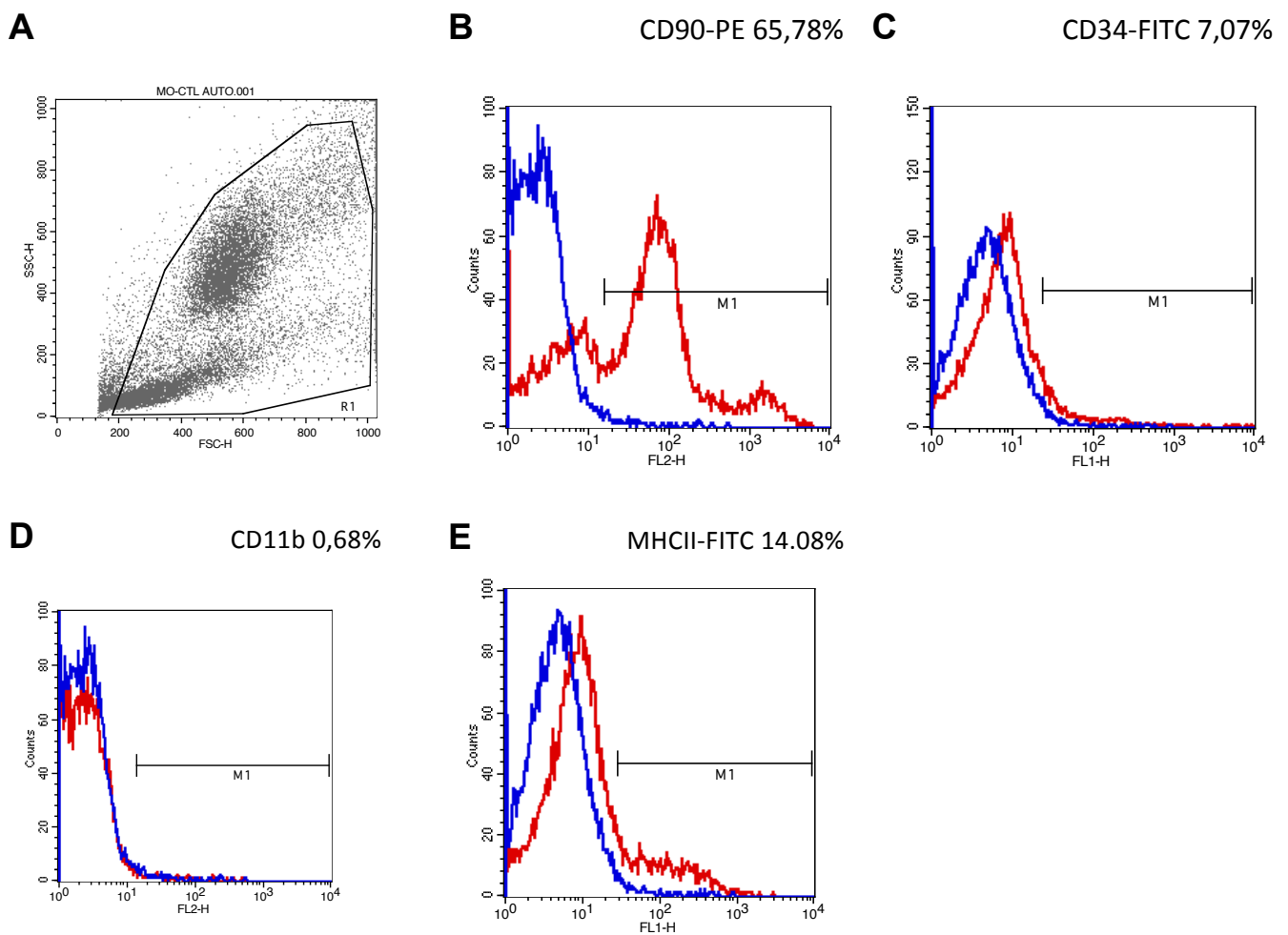


Figura 4. Fenotipagem de células mononucleares de lobo-guará revelada pela citometria de fluxo. **(A)** Gate; **(B)** CD90; **(C)** CD34; **(D)** CD11b e **(E)** MHCII.

Viabilidade celular

Para o teste de viabilidade celular por citometria de fluxo todas as amostras foram avaliadas em cultivo em sexta passagem. Os resultados das três amostras analisadas antes do processo de criopreservação apontaram viabilidade média de 94,89%, sendo amostra 1: 94,71%; amostra 2: 94,77%; e amostra 3: 95,20%, evidenciando baixa mortalidade ou células apoptóticas (Figuras 5B, C e D). O mesmo teste foi repetido após o processo de criopreservação e revelou uma viabilidade media de 77,21%, com amostra 1: 70,83%; amostra 2: 83,29%; e amostra 3: 77,20%, constatando taxas maiores de células mortas ou em apoptose comparada com as células antes da criopreservação (Figura 6).

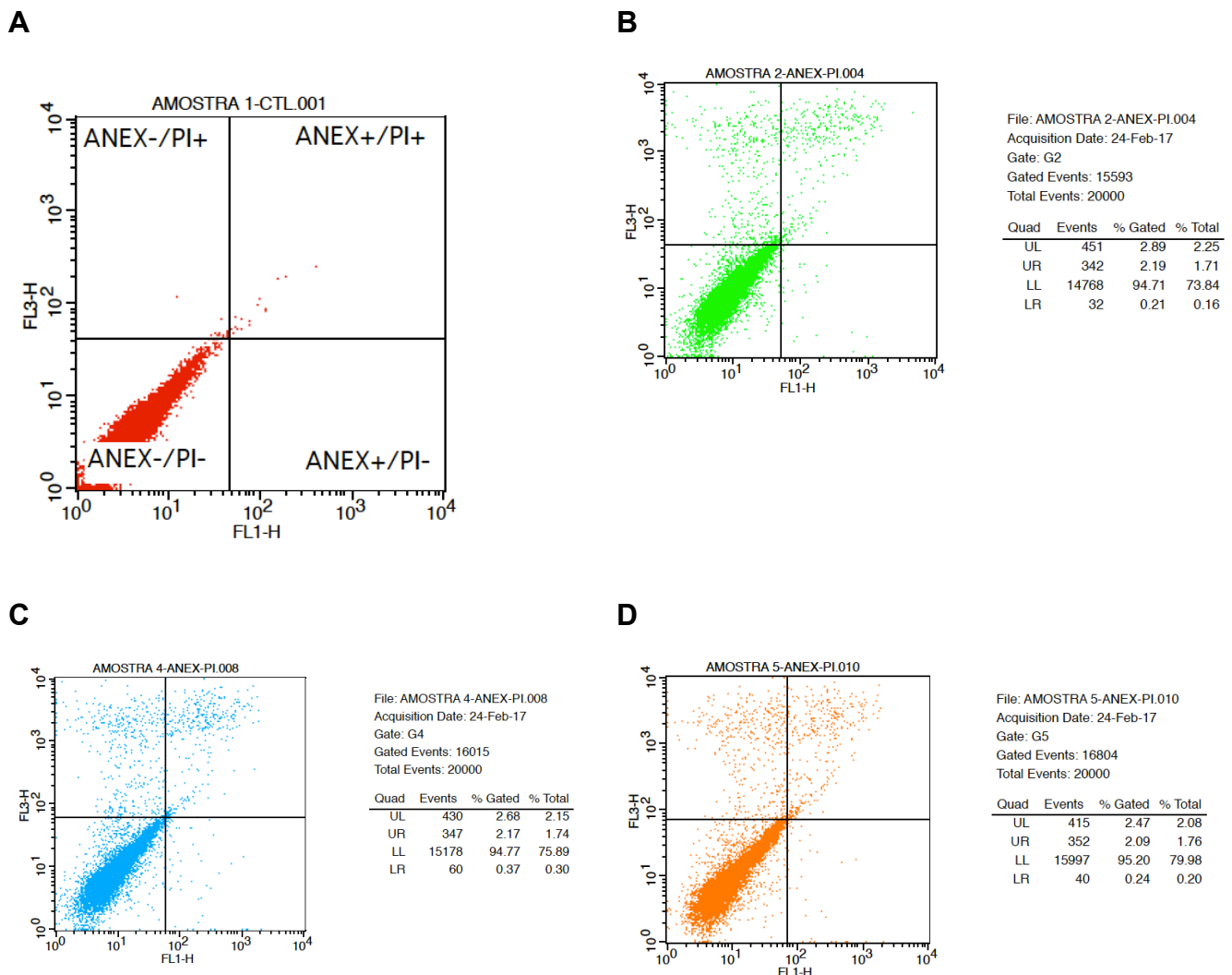


Figura 5. Viabilidade das células mesenquimais de lobo-guará por citometria de fluxo. Quadrantes UL: Anex -/IP+; UR: ANEX +/IP-; LL: ANEX-/IP- (controle); LR: ANEX+/IP-. ANEX: Anexina. PI: Iodeto de Propídio. Positivo (+) e negativo(-).

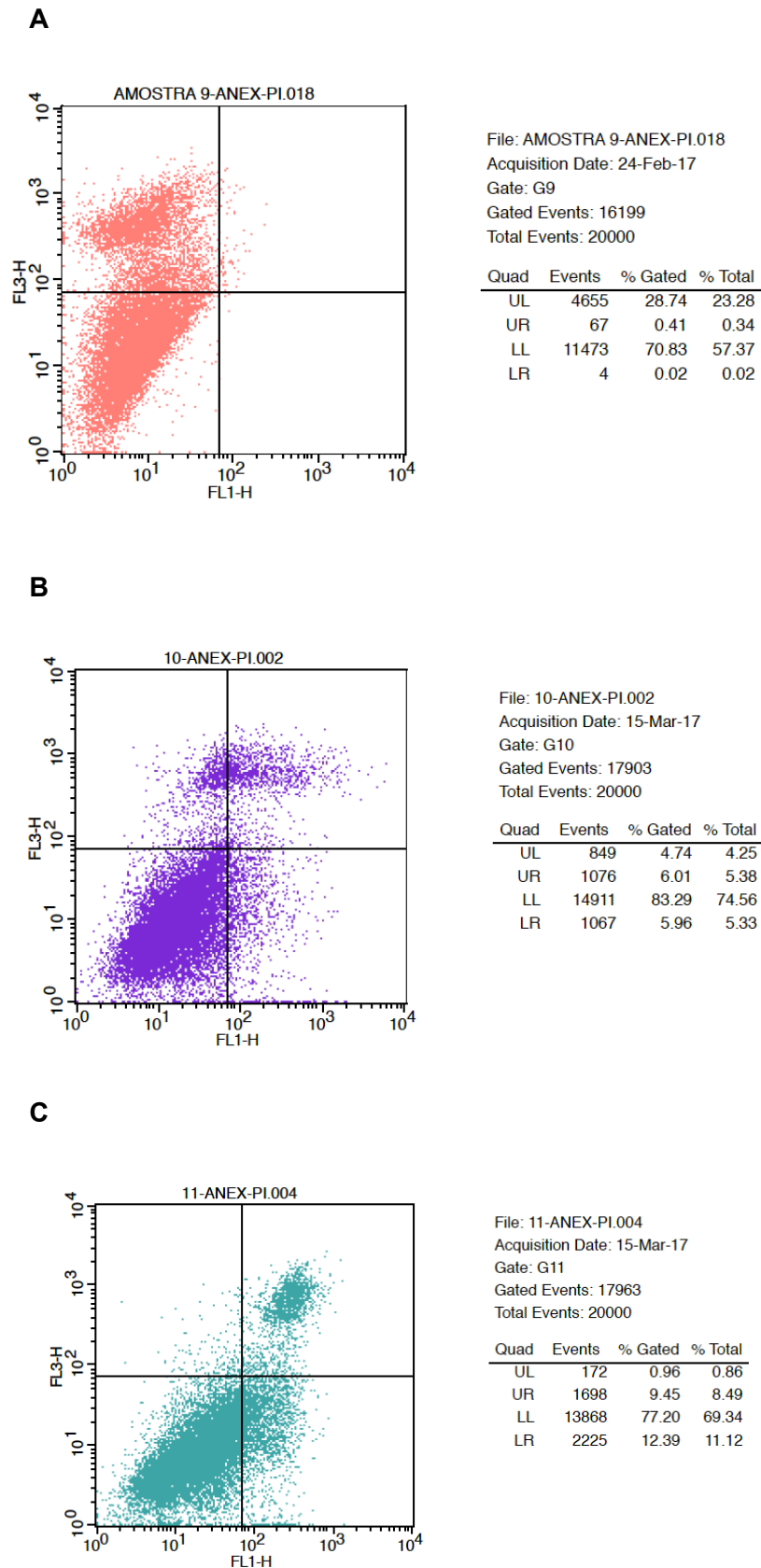


Figura 6. Viabilidade das células mesenquimais de lobo-guará após criopreservação por citometria de fluxo. Quadrantes UL: Anex -/IP+; UR: ANEX +/IP-; LL: ANEX-/IP- (controle); LR: ANEX+/IP-. ANEX: Anexina. PI: Iodeto de Propídio. Positivo (+) e negativo (-).

Potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais

A capacidade das CTMs se diferenciarem em tecidos osteogênico, adipogênico e condrogênico foi avaliada (Figura 7). Observou-se no 21^o de cultivo gotículas lipídicas positivas para a coloração de *Oil Red* para a diferenciação adipogênica (Fig. 7B). O potencial de diferenciação osteogênica foi avaliada pela formação de depósitos de cálcio extracelular demonstrado pela coloração positiva ao Alizarin Red no 15^o do cultivo (Fig. 7C). Para diferenciação condrogênica foram realizados cortes histológicos mostrando presença de nódulos celulares entremeados por uma matriz extracelular de glicosaminoglicano no 21^o de cultivo, pela coloração de Alcian Blue (Fig. 7D), comparado com células somente em meio proliferativo para controle (Fig. 7A).

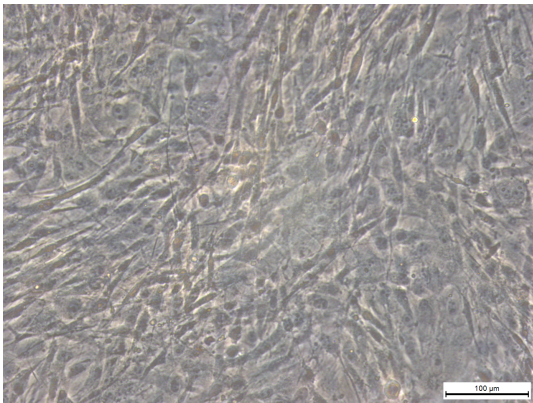
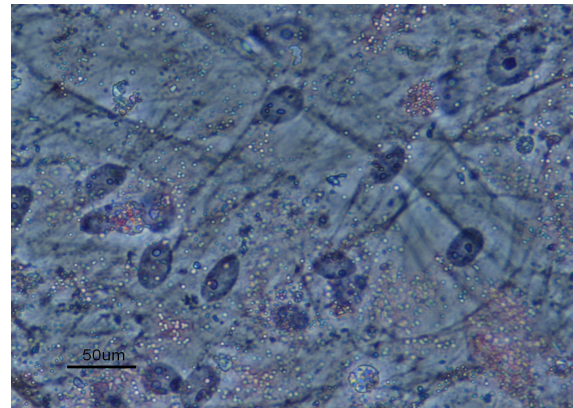
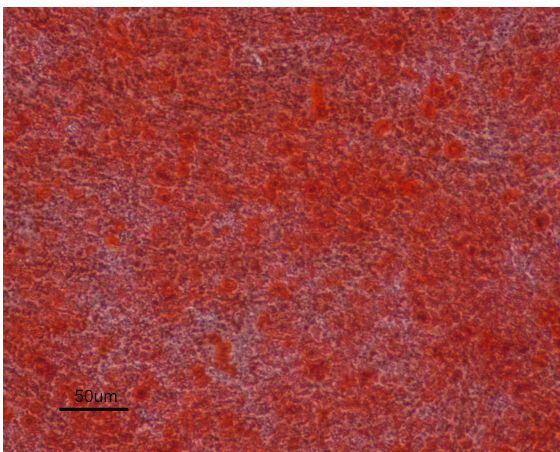
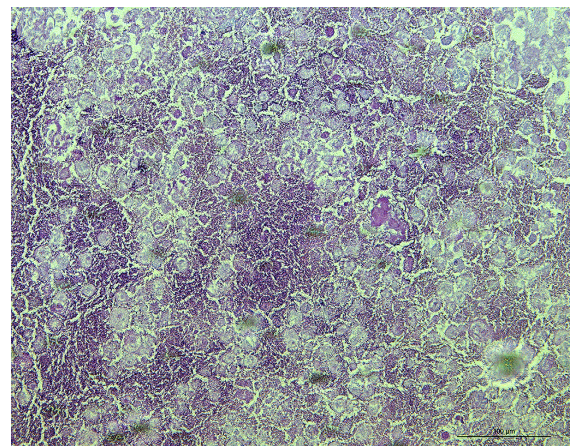
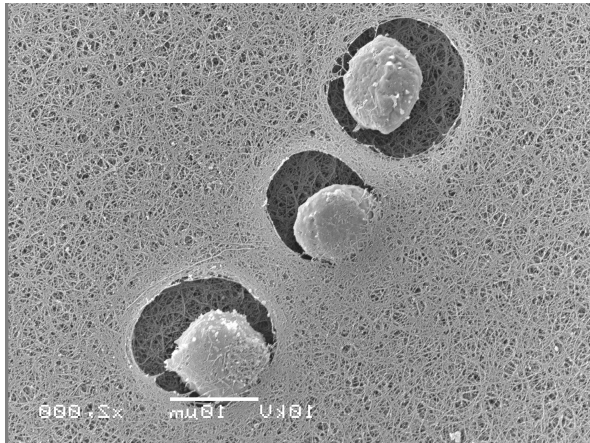
A**B****C****D**

Figura 7. Potencial de diferenciação das CTMs de lobo-guará em linhagens osteogênica (**B**); adipogênica (**C**); e condrogênica (**D**). (**A**) Controle (aumento 40x).

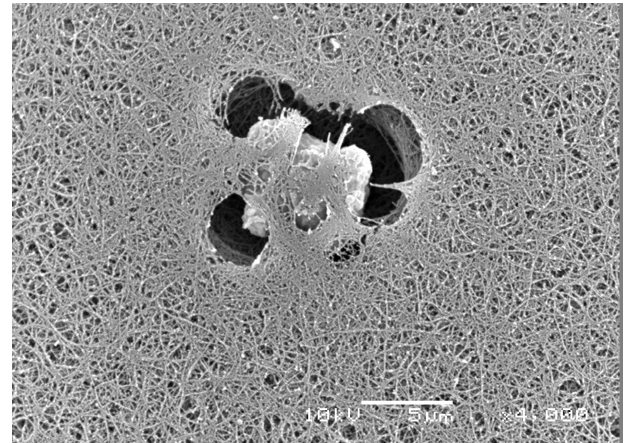
Microscopia de varredura

A visualização na microscopia de varredura avaliou a interação das células tronco mesenquimais com o selante heterólogo de fibrina verificando-se a sua completa adesão (Figuras 8 A e B). Células mesenquimais com a ausência do selante de fibrina foram visualizadas para controle (Figura 8 C e D).

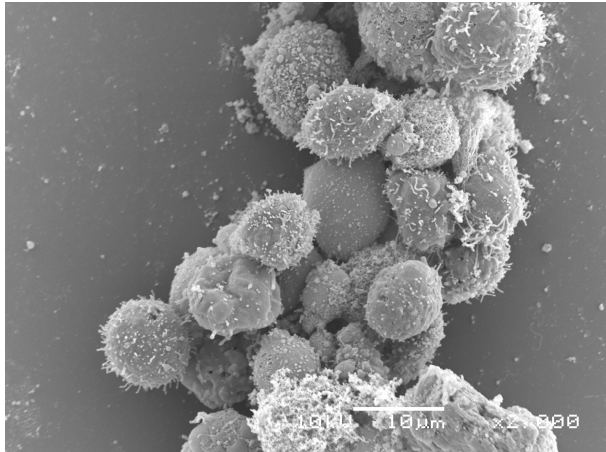
A



B



C



D

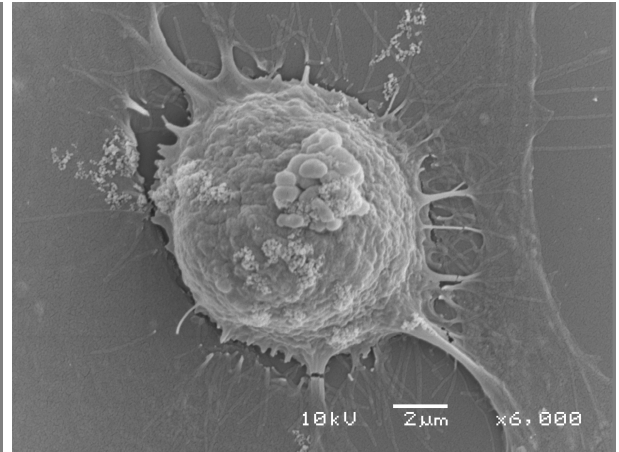


Figura 8. Análise em Microscopia de Varredura de células tronco mesenquimais de lobo-guará associado com o selante heterólogo de fibrina. **(A e B)** Células tronco mesenquimais associado ao selante de fibrina (aumento de 2.000 x e de 4.000 x). **(C e D)** Células mesenquimais de lobo-guará (aumento de 2.000 x e 6.000 x).

Microscopia confocal

Ficou evidenciado através da microscopia confocal que o selante heterólogo de fibrina associado com as CTMs de lobo-guará apresentou-se como um arcabouço tridimensional para as células. Isso foi comprovado através da visualização por fluorescência da gioxina (um dos 3 componentes do selante) que foi marcado com o Alexa flúor 647 e das CTMs que foram marcadas com Hoeschst 33342 (Figura 9).

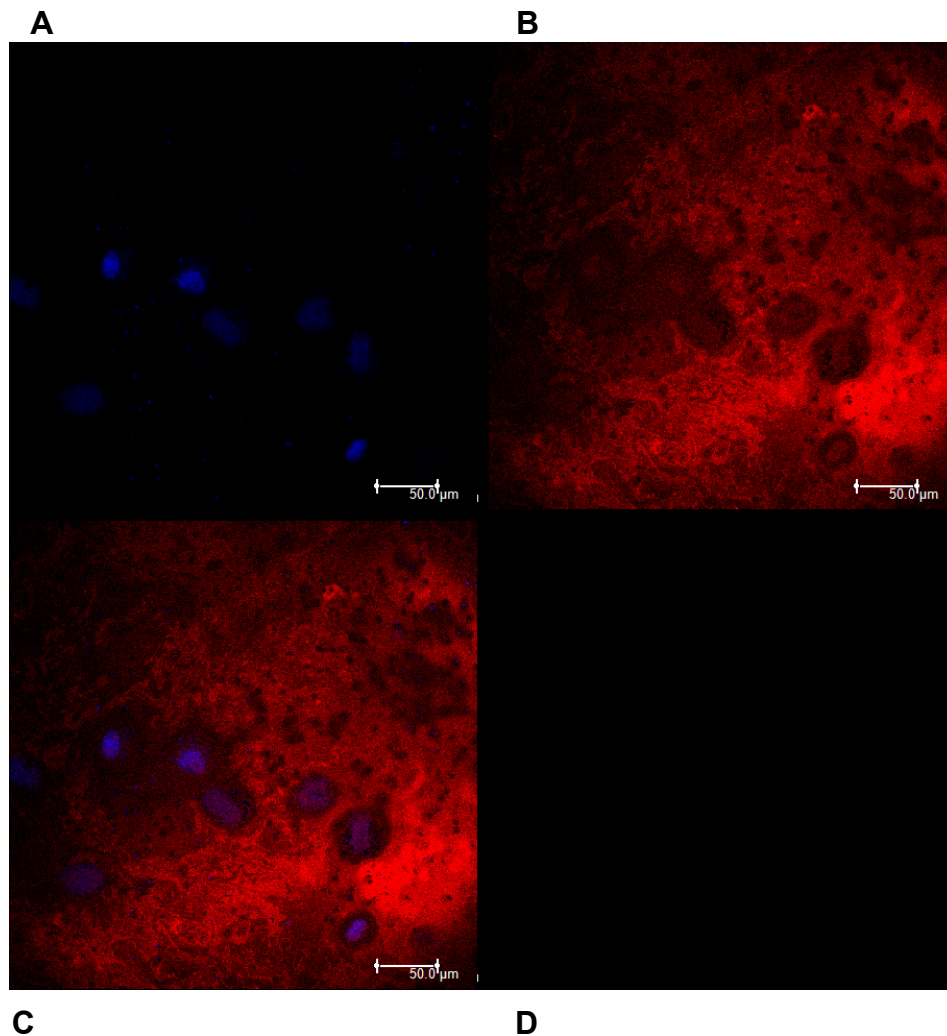


Figura 9. Células tronco mesenquimais de lobo-guará e selante de fibrina analisados no microscópio confocal. **(A)** Cor em azul para células marcadas com Hoeschst 33342. **(B)** Em vermelho marcação da gioxina (um dos 3 componentes do selante) com Alexa flúor 647. **(C)** Células e selante sobrepostos. **(D)** Controle - células e selante sem marcação.

DISCUSSÃO

O conhecimento de técnicas de coleta de medula óssea, bem como o isolamento e cultivo de células tronco de *Chrysocyon brachyurus* é extremamente necessário já que trata-se de uma espécie em extinção e um banco de células é importante para a preservação da espécie.

Os sítios de coleta de medula óssea em cães mais utilizados são úmero, fêmur, tibia, osso ilíaco^(21, 22, 23). O aspirado de medula óssea foi realizado na crista do osso ilíaco conferindo bom acesso e boa quantidade de material para seu cultivo.

As CTMs de *Chrysocyon brachyurus* foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular com rápida aderência ao plástico e observação da morfologia fibroblastóide, em 8 dias demonstrou confluência de 50% analisado em microscópio óptico. A primeira passagem foi feita após 15 dias do cultivo primário. As células foram expandidas até chegarem a sexta passagem com intervalos de aproximadamente 5 dias entre elas. Em estudo em cultivo de células mesenquimais de medula óssea em cães observou-se colônias distintas em 5 dias em cultura e a confluência de 70-80% se deu após 8-9 dias, expandidas até quinta passagem, o que se assemelha ao cultivo de células de lobo-guará^(23, 24, 25).

Os dois marcadores positivos utilizados para a avaliação por citometria de fluxo se mostraram eficientes no reconhecimento da espécie. O CD90 específico para cães se mostrou melhor que o CD44, pois este apresentava reação cruzada com outras espécies. Em relação aos marcadores negativos utilizados, o MHCII, o CD11b e o CD34 se mostraram eficazes para as células mesenquimais de lobo-guará.

Por não haver marcadores comerciais específicos para o lobo-guará, nem ao menos relatos na literatura de cultivo de células tronco para esta espécie, fez-se necessário a realização de testes controle na relação dos marcadores negativos para as células mesenquimais, com o intuito de confirmar o reconhecimento da espécie estudada. O MHCII expressou 14,08% quando analisado em células mononucleares de medula óssea de lobo-guará, sendo que esse marcador não é específico para cães e também reage para células de ratos. O CD11b foi avaliado previamente em sangue periférico de lobo-guará, pois é marcador de células

imunes, e conferiu 23,31% de marcação. No entanto, esse marcador reconhece também as espécies camundongo, rato, coelho, cão, porco, humano e macaco o que pode gerar marcações inespecíficas. Mesmo com um padrão de várias espécies reativas, o CD11b conseguiu marcar as células caninas. O CD34 utilizado é específico para a espécie canina e foi avaliado previamente em células mononucleares de medula óssea, e conferiu 7,07%, pois o CD34 é um marcador de células desta linhagem. Assim, foi possível demonstrar que os marcadores utilizados foram capazes de reconhecer a espécie do estudo.

A avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo mostrou-se eficiente com os marcadores utilizados. As células foram marcadas com Iodeto de Propídio, o qual marca células mortas ou totalmente inviáveis, bem como a Anexina V que marca células que estão entrando em processo de apoptose. As amostras analisadas em triplicata revelaram viabilidade média de 94,89% antes do processo de criopreservação, e de 77,21% após a criopreservação das células com DMSO e soro fetal bovino. Estes resultados evidenciam uma queda na viabilidade celular de cerca de apenas 20% após a criopreservação, o que mostra ser extremamente satisfatória a adoção desta técnica para a sua preservação.

Soluções de criopreservação contendo *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) são frequentemente usados para criopreservação de células tronco, entretanto DMSO pode também ser tóxico e afetar a capacidade de proliferação e diferenciação celular após o descongelamento ^(26, 27).

GINIS e colaboradores (2012) avaliaram viabilidade das células mesenquimais humanas após criopreservação com DMSO e observaram cerca de 15 a 18% de apoptose das células corroborando nossos resultados ⁽²⁸⁾. Segundo Houxuan Li. et al. (2009), quando avaliaram em cães a viabilidade de células congeladas com DMSO, demonstraram que não houve diferença significativa comparada com células antes do congelamento ⁽²⁹⁾.

Todas as amostras foram avaliadas em cultivo de sexta passagem. Estudos mostram isolamento de células mesenquimais de medula óssea em cães até a terceira passagem ⁽³⁰⁾ e quinta passagem, no entanto sem relatos de teste de viabilidade ⁽³¹⁾. Em estudo realizado a partir do cultivo de células de gordura, medula óssea e omento de cães, chegando até a sexta e sétima passagem foi avaliado a

viabilidade apenas em Câmara de Neubauer e com o corante Azul de Tripan^(24,29). Estes autores também demonstraram boa viabilidade celular após o descongelamento e destacaram o seu potencial de uso^(24,29), porém o uso do Azul de Tripan possui baixa especificidade quando comparada com a análise por citometria de fluxo⁽³²⁾.

A capacidade das CTMs se diferenciarem em tecidos osteogênico, condrogênico e adipogênico foi avaliada e é de extrema importância por se tratar de uma espécie ainda não descrita. A diferenciação adipogênica, observada no 21^o de cultivo mostrou gotículas lipídicas positivas para a coloração de *Oil Red*. A diferenciação osteogênica foi avaliada pela formação de depósitos de cálcio extracelular demonstrado pela coloração positiva ao Alizarin Red no 15^o de cultivo. Para a diferenciação condrogênica, os cortes histológicos apresentaram nódulos celulares entremeados por uma matriz extracelular de glicosaminoglicano que foram detectados no 21^o de cultivo, pela coloração de Alcian Blue, comparado com células somente em meio proliferativo. As evidências das diferenciações são importantes pois denotam a comprovação da imunofenotipagem e o potencial biológico das CTMs ainda não analisadas em lobo-guará.

A microscopia de varredura comprovou a interação das células tronco mesenquimais com o selante de fibrina. Células mesenquimais com a ausência do selante de fibrina foram visualizadas para controle. A morfologia mostrou que o selante de fibrina não afetou a adesão celular e sua proliferação e permitiu aderência de células mesenquimais na sua superfície, como também demonstraram Gasparotto et. al. (2014) pela microscopia de varredura a interação de células mesenquimais com o selante⁽¹¹⁾.

A microscopia confocal revelou que o selante heterólogo de fibrina associado com as CTMs de lobo-guará apresentou-se como um arcabouço tridimensional para as células. A marcação de apenas um dos componentes do selante foi o suficiente para a sua observação, pois este interagiu com os demais componentes no momento de sua mistura. O selante de fibrina tem grande potencial de usos clínico com sucesso como um *scaffold* para células tronco, prolongando a vida das células no local da lesão e promovendo a regeneração, visto em tratamentos isolados demonstrados em trabalhos com nervos⁽³³⁾, neurônios⁽³⁴⁾, reparação óssea⁽²⁴⁾ entre outros.

Desta maneira, as análises morfológicas visualizadas pela microscopia são de suma importância pois comprovam a capacidade do biomaterial para manter a sobrevivência das células justificando seu uso em diversos tecidos.

Conclusão

Foi demonstrado a coleta de medula óssea, o cultivo e a capacidade de diferenciação das CTMs de lobo-guará, com grande semelhança à estudos com cães domésticos. Sua possibilidade de utilização com um *scaffold* biológico como o selante heterólogo de fibrina enaltece seu potencial de uso terapêutico, já que muitos animais são encontrados com fraturas, devido a atropelamentos em estradas, ou chegam com lesões variadas. Esta terapia celular pode proporcionar um tratamento alternativo e eficaz na agilidade de processos regenerativos, minimizando o estresse em tratamentos convencionais de longa duração. O sucesso na criopreservação das CTMs torna possível a criação de um banco de células tronco que certamente ajudará na conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

1. Dietz, J. M.. Ecology and social organization of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*. Smithsonian contributions to zoology. 392, 1-51, No 59 SMI (1984)
2. Paula, R. C. et. al. Avaliação do risco de extinção do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. Biodiversidade Brasileira, 3(1), 146-159 (2013)
3. Mikich, S. B., & Bérnils, R. S. Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Instituto ambiental do Paraná (2004)
4. Fonseca, G. A. Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. Fundação Biodiversitas (1994)
5. Brito, H.F.V. et. al. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Medvep-Revista Científica de Medicina Veterinária-Pequenos Animais e Animais de Estimação, 8(24), 26-29, (2010)
6. Young R.G. et. al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair, Journal of Orthopaedic Research, 16(4),406-413. Doi: 10.1002/jor.1100160403 (2008)
7. Mathieu, D.V.M et. al. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 138, 646-653 Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.12.031> (2009)
8. Kazemi, D. et. al. Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin. Macroscopic and histological assessments. Department of Veterinary Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. 6, 98-107 Doi: 10.1302/2046-3758.62.bJr- 2016-0188.r1 (2017)
9. Moraes, L.F. and Takahira, R.K. Aplastic bone marrow in dogs. *Revista de Ciências Agroveterinárias.*, 9(1),99-108 ISSN 2238-1171 (2010)
10. Reich, C. M. et. al. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue-and bone marrow-derived mesenchymal stem cells—a comparative study. *Veterinary research communications*,36(2),139-148. Doi:10.1007/s11259-012-9523-0 (2012)
11. Gasparotto V.P.O et. al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.*; 5, 78-88. Doi: 10.1186/scrt467 (2014)
12. Borst, H. G et al. Fibrin adhesive: an important hemostatic adjunct in cardiovascular operations. *J. Thoracic Cardiovasc. Surg.* 84(4),548–553 (1982)

- 13.** Autologous Bone Marrow–Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds Falanga V. et al. *Tissue Engineering.* 13(6), 1299-1312 Doi: <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0278> (2007)
- 12.** Barros L.C. et. al. A New Fibrin Sealant from *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine. *J Toxicol Environ Health.*; 12, 553-71. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10937400903442514> (2009)
- 13.** Thomazini-Santos I.A. et. al. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, reptilase, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubalinee human cryoprecipitates. *J Venom Anim Toxins.* 4, 120-36. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-79301998000200004> (1998)
- 14.** Biscola N. P. et. al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 23, 13p. Doi: <10.1186/s40409-017-0103-1> (2017)
- 15.** Buchaim D. V. et. al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers in Medical Science.* 25,1-8, Doi:<10.1007/s10103-016-1939-2> (2016)
- 16.** Machado E. G. et. al. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. *Acta Histochemica.* 117, 288-296. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.03.006> (2015)
- 17.** Cunha M. R. Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats. *Materials Research.* 18, 196-203, Doi:<10.1590/1516-1439.316014> (2015).
- 18.** Cartarozzi L. P. et. al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulates schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Research Bulletin.* 112, 14-24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.01.005> (2015).
- 19.** Seabra Ferreira, Rui. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 20, 31. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-20-31> (2014).
- 20.** Ferreira, Rui Seabra. et. al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside - an overview. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 23, 1, <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-017-0109-8> (2017).
- 21.** Muller M. C. D. *et al.* Techniques and bone marrow sites sampling in dogs and cats. *Ciência rural*, Santa Maria, v.39, n.7, p.2243-2251. ISSN 0103-8478 (2009)
- 22.** Spencer D. N. et al. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived adipose tissue-derived stromal cells. *The Veterinary Journal.* 191 (2012) 231–239. Doi:<10.1016/j.tvjl.2010.12.030> (2010)

- 23.** Chung J. D. et al. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Research in Veterinary Science*. 92, 66–75 Doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.012 (2012)
- 24.** Sprada G. A. et al. Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal cells from adipose tissue in different culture passages. *Pesq. Vet. Bras.* 35(1),15-20. Doi: 10.1590/S0100-736X2015001300004 (2015)
- 25.** Hoch I. A. & Leach, K. J. Concise Review: Optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/ stromal cells for clinical applications. *Stem cells translational medicine* 3:643–652 Doi: <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2013-0196> (2014)
- 26.** Hunt C. J. et al. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfus. Med. Hemother.* 38, 107–123. Doi: 10.1159/000326623 (2011)
- 27.** Edamura K. et al. Effects of Cryopreservation on the Cell Viability, Proliferative Capacity and Neuronal Differentiation Potential of Canine Bone Marrow Stromal Cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76(4), 573–577. <http://doi.org/10.1292/jvms.13-0296> (2014)
- 28.** Ginis M. D. I. et al. Evaluation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells After Cryopreservation and Hypothermic Storage in Clinically Safe Medium. *Tissue Engineering: Part C Volume 18, Number 6, 2012* Doi: 10.1089/ten.tec.2011.0395 (2012)
- 29.** Houxuan Li. et al. Application of Autologous Cryopreserved Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Periodontal Regeneration in Dogs Cells Tissues Organs 2009;190:94–101 Doi: 10.1159/000166547 (2009).
- 30.** Hiroaki Ka. et al. Expression of neural markers on bone marrow–derived canine mesenchymal stem cells. 67 (11)1928, 1921-1928 Doi: <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.11.1921>(2006)
- 31.** Muir P. et al. Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Molecular Markers of Inflammation in Dogs with Cruciate Ligament Rupture. *Plos one* Doi:10.1371/journal.pone.0159095 (2016)
- 32.** Chan L. L. et al. Automated Enumeration and Viability Measurement of Canine Stromal Vascular Fraction Cells Using Fluorescence-Based Image Cytometry Method. Springer Science+Business Media. Doi: 10.1007/s10895-014-1388-x (2014)
- 33.** Buchaim L. R. et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury, Int. j. Care Injured* 46: 655-660 (2015)
- 34.** Barbizan R. et al. Influence of Delivery Method on Neuroprotection by Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy following Ventral Root Reimplantation with Fibrin Sealant. *Plos One*. 9, (8) Doi:105712 (2014)

ANEXO I

CERTIFICADO Nº 1143/2015-CEUA

Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1143-2015) Uso do selante de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço tridimensional para células tronco mesenquimais da medula óssea de lobo-guará (*Chrysocyon Brachyurus*), a ser conduzido por Andréa Sebelim Sesso, orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, coorientada por João Ferreira de Lima Neto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	31/07/2017
Espécie/Linhagem	Lobo-Guará
Nº de animais	06
Peso/Idade	Não informado
Sexo	Macho
Origem	Zoológico de Sorocaba/Zoológico de Paulínia/CEMPAS-UNESP

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 30/07/2015

Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros
Presidente da CEUA

Kleber Messias Camargo
Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA