

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU, FMB, UNESP  
CENTRO DE ESTUDOS DE VENENOS E ANIMAIS PEÇONHENTOS,  
CEVAP, UNESP, CAMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO SELANTE DE FIBRINA  
DERIVADO DE VENENO DE SERPENTE COMO ARCABOUÇO  
BIOLÓGICO PARA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE  
MEDULA ÓSSEA DE RATOS**

**VINÍCIUS PERON DE OLIVEIRA GASPAROTTO**

**Botucatu – SP  
Setembro de 2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU, FMB, UNESP  
CENTRO DE ESTUDOS DE VENENOS E ANIMAIS PEÇONHENTOS, CEVAP,  
UNESP, CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO SELANTE DE FIBRINA  
DERIVADO DE VENENO DE SERPENTE COMO ARCABOUÇO  
BIOLÓGICO PARA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE  
MEDULA ÓSSEA DE RATOS**

VINÍCIUS PERON DE OLIVEIRA GASPAROTTO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Doenças Tropicais da  
Faculdade de Medicina de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Co-orientador: Dr. João Ferreira de Lima Neto

Botucatu – SP  
Setembro de 2012

Nome do Autor: Vinícius Peron de Oliveira Gasparotto

Título: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DE VENENO DE SERPENTE COMO ARCABOUÇO BIOLÓGICO PARA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE RATOS

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior

Presidente e Orientador

Departamento de Doenças Tropicais / Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP

FMB – UNESP – Botucatu / SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu / SP

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Membro

Departamento

IB – UNICAMP – Campinas / SP

Data da defesa: 10 de setembro de 2012

**Dedico aos meus Pais, Irmã e Avós, que sempre mantiveram a confiança  
em meu trabalho.**

**Dedico em especial ao meu avô José Alves de Oliveira (*in memoriam*)  
pelas sábias lições, um exemplo para mim.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pela vida maravilhosa que tenho, por colocar sempre pessoas incríveis em meu caminho e pelas experiências que vivi.

A meu orientador, **Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior**, pela dedicação, pelas idéias construtivas, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelas cobranças e exigências para que sempre buscássemos resultados cada vez melhores, chegando assim a conclusão de mais uma etapa.

A **Profª. Drª. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**, pela disponibilidade em abrir as portas de seu laboratório e permitir a realização de meus estudos e experimentos. Obrigado pela paciência e imenso conhecimento transmitido.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira** pelo total apoio na realização dos experimentos em Campinas – UNICAMP e pela grande contribuição durante as análises dos materiais e redação da dissertação.

A minha **mãe**, por ser a pessoa mais incrível e maravilhosa que conheço! Carinhosa, compreensiva, chefe de família e sempre muito dedicada.

Ao meu **pai**, às vezes distante, porém sempre presente, pelo total apoio e paciência seja qual fosse minha decisão, pelas conversas e conselhos. Obrigado pelo companheirismo.

A minha **irmã**, um exemplo pra mim.

Aos meus **avós**, sem vocês nada seria possível. Sempre presentes e dispostos a fazer de tudo para ajudar, meus segundos pais! Muito Obrigado.

A **Ana Paula**, minha namorada, amiga, companheira. Pelo amor, dedicação e paciência. Amo você.

Aos **familiares**, tios, tias, primos e primas, em especial a **Mí**, pelo total apoio no início desta jornada. Obrigado apenas pelo fato de existirem e proporcionarem sempre bons momentos.

Aos **meus cachorros**, Killer, Boris e Barth, companheiros incondicionais.

Aos meus **amigos** de Lins, irmãos de pais diferentes, sempre presentes com muita alegria. Obrigado pela força sempre.

Aos grandes **amigos** de Botucatu, Michelle, Eduardo, Natália, Thales, Raquel, Priscilla Mitie, Priscila Macedo, Renato, Karen, Gustavo, Tiago, Tidei, Juliana, Vivian, Roberta, Daniela, Andréia, Camila (Xuxu), Mydian, Amanda... Muito obrigado, pois de alguma maneira vocês fazem parte disso também.

Ao **Dr. João** e **Dr. Paulo** pelo incentivo, pela disposição em ajudar e discutir o projeto, pelas contribuições, pelo grande conhecimento a mim transmitido e pela amizade verdadeira.

Aos **colegas do laboratório** da FMVZ – UNESP – Botucatu e IB – UNICAMP - Campinas.

Aos **funcionários do CEVAP**, Granieri, Dona Dirce, Sheila, Marli, Sérgio, Paulo e Seu Antônio, pelas colaborações e momentos de alegria.

As amigas do **Hemocentro**, Marjorie e Léia, pelo processamento do material.

Ao **Prof. Dr. Benedito Barraviera**, diretor do CEVAP, pelas contribuições neste trabalho.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que por algum descuido não foram mencionados, mas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Meus mais sinceros agradecimentos**

***“Falar é uma necessidade, escutar é uma arte”.***

*Johann Goethe*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Animal eutanasiado com sobre dose de halotano pronto para coleta dos fêmures e tíbias.....	14
FIGURA 2	Fêmures e tíbias coletados, prontos para lavagem da cavidade óssea e coleta de medula.....	15
FIGURA 3	Lavagem da cavidade óssea de fêmures e tíbias e coleta de medula com DMEM.....	15
FIGURA 4	Fração de células mononucleares separadas por diferença de densidade. Região em destaque (circulo amarelo) evidenciando o anel formado de onde serão coletadas as células para cultivo.....	17
FIGURA 5	Material coletado e acondicionado em frasco de cultivo celular.....	17
FIGURA 6	Formação do coágulo de fibrina (seta amarela), após a união dos componentes do Selante de Fibrina.....	25
FIGURA 7	Aspecto da rede de fibrina característica formada pelo Selante de Fibrina produzido pelo CEVAP. MO (100X).....	26
FIGURA 8	Morfologia fibroblastóide (seta amarela) característica das CTMs, observadas em microscopia óptica de luz invertida. MO (200X).....	27
FIGURA 9	Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de primeira passagem revelando baixa marcação para o marcador CD34.....	29
FIGURA 10	Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de primeira passagem revelando alta marcação para o marcador CD44.....	29

FIGURA 11	Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de primeira passagem revelando alta marcação para o marcador CD90.....	29
FIGURA 12	Coloração das células com Oil Red-O Solution indicando a presença de gotas ricas em lipídeos no interior das células. MO (400X).....	30
FIGURA 13	Coloração Alcian Blue indicando a presença de proteoglicanos produzidos pelos condrócitos. Célula em processo de diferenciação (seta amarela). MO (400X)....	31
FIGURA 14	Coloração Alizarin Red indicando a deposição de cálcio realizada pelos osteócitos no meio extracelular. MO (200X).....	32
FIGURA 15	Coloração das células com Oil Red-O Solution indicando a ausência de significativa marcação para este corante. MO (200X).....	33
FIGURA 16	Região do biomaterial (estrela amarela). Não houve marcação para o corante Alcian Blue. MO (200X).....	34
FIGURA 17	Marcação relevante pelo corante Alizarin Red na presença do Selante de Fibrina. Região do biomaterial (estrela amarela). MO (200X).....	35
FIGURA 18	Selante de Fibrina (estrela vermelha) e presença das CTMs após 2 dias de cultivo com morfologia fibroblastóide (seta amarela). MO (200X).....	36
FIGURA 19	Fragmentos de Selante de Fibrina (estrelas vermelhas) e proliferação celular ao redor do biomaterial (setas amarelas). MO (200X).....	36
FIGURA 20	Região do Selante de Fibrina (estrela vermelha) e proliferação das CTMs com confluência ao redor de 60% (seta amarela). MO (200X).....	37

FIGURA 21	Rede de fibrina com aspecto de “teia de aranha” (setas amarelas). MO (200X).....	37
FIGURA 22	Células capturadas pela rede de fibrina (setas amarelas). MO (200X).....	38
FIGURA 23	CTMs projetando-se em direção a superfície do biomaterial (setas amarelas). MO (200X).....	38
FIGURA 24	Coloração de Hoescht 33342 e Iodeto de Propidium para análise da viabilidade celular de CTMs cultivadas na presença do Selante de Fibrina. MF (200X).....	39
FIGURA 25	Ultra-estrutura de amostra do Selante de Fibrina à microscopia eletrônica de varredura. Presença de alguns grânulos de cálcio referente a solução de cloreto de cálcio onde o material é reconstituído (setas amarelas). Superfície do “tapete” formado pela intensa rede de fibrina (estrela vermelha). MEV (2000x).....	40
FIGURA 26	Em maior aumento pode-se observar a intensa rede de fibrina formada (estrela vermelha) pelo Selante de Fibrina. MEV (4000x).....	40
FIGURA 27	“Tapete” formado pelo Selante de Fibrina (estrela vermelha) e a presença de grande quantidade de CTMs aderidas a superfície do biomaterial (setas amarelas). MEV (400x).....	41
FIGURA 28	Intensa rede de fibrina formada (estrela vermelha). Interação e crescimento celular na superfície do biomaterial (seta amarela). CTMs capturadas e recoberta pela rede de fibrina (estrela amarela). MEV (1000x).....	42

FIGURA 29	Prolongamentos celulares em direção ao interior do biomaterial após 8 dias de cultivo celular. MEV (4000X).....	42
FIGURA 30	Projeções celulares (estrelas vermelhas) e a matriz depositada, possivelmente formada pelo Selante de Fibrina (setas amarelas). MET (Manila + Citrato de Chumbo) (3000X).....	43
FIGURA 31	Presença do núcleo celular (N), camadas formadas por projeções celulares (estrelas vermelhas) e matriz depositada (seta amarela). MET (Manila + Citrato de Chumbo) (6000X).....	44

## LISTA DE TABELA

TABELA 1	Volume de medula óssea mais meio de coleta, coletada a partir dos fêmures e tíbias de ratos, número de células isoladas da fração mononuclear, número de células por mL e número de células na primeira passagem por amostra.....	28
----------	---	----

## SUMÁRIO

Resumo .....	01
Abstract .....	02
1. INTRODUÇÃO .....	03
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 Obtenção do Selante de Fibrina .....	13
3.2 Obtenção das células tronco mesenquimais .....	13
3.2.1 <i>Animais</i> .....	13
3.2.2 <i>Colheita de medula óssea de rato</i> .....	14
3.2.3 <i>Isolamento da fração de células mononucleares</i> .....	16
3.3 Caracterização das células tronco .....	18
3.3.1 <i>Células tronco mesenquimais</i> .....	18
3.4 Diferenciação celular .....	19
3.4.1 <i>Diferenciação para linhagem adipogênica</i> .....	19
3.4.2 <i>Diferenciação para linhagem condrogênica</i> .....	20
3.4.3 <i>Diferenciação para linhagem osteogênica</i> .....	20
3.5 Diferenciação espontânea das CTMs <i>in vitro</i> com a presença do biomaterial .....	21
3.6 Associação do Selante com as células tronco .....	21
3.6.1 <i>Preparo e cultivo do biomaterial</i> .....	21
3.7 Avaliação <i>in vitro</i> do crescimento e viabilidade celular junto ao biomaterial .....	22

3.7.1 Microscopia óptica de luz invertida .....	22
3.7.2 Microscopia de fluorescência .....	22
3.7.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	23
3.7.4 Microscopia eletrônica de transmissão .....	23
4. RESULTADOS .....	25
4.1 Selante de Fibrina .....	25
4.2 Isolamento e caracterização das células tronco mesenquimais .....	26
4.2.1 Citometria de fluxo.....	28
4.3 Diferenciação e marcação para linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica .....	30
4.3.1 Diferenciação para linhagem adipogênica .....	30
4.3.2 Diferenciação para linhagem condrogênica .....	31
4.3.3 Diferenciação para linhagem osteogênica .....	32
4.4 Avaliação da diferenciação espontânea das CTMs <i>in vitro</i> com a presença do biomaterial .....	33
4.4.1 Diferenciação espontânea para linhagem adipogênica .....	33
4.4.2 Diferenciação espontânea para linhagem condrogênica .....	34
4.4.3 Diferenciação espontânea para linhagem osteogênica .....	35
4.5 Avaliação <i>in vitro</i> de crescimento e viabilidade celular junto ao biomaterial .....	35
4.5.1 Avaliação por microscopia óptica de luz invertida .....	35
4.5.2 Avaliação por microscopia de fluorescência .....	39
4.5.3 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura .....	39
4.5.4 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão .....	42
5. DISCUSSÃO .....	45
5.1 CTMs – Isolamento e caracterização .....	45
5.2 Biomaterial – Selante de Fibrina .....	49

6. CONCLUSÕES .....	52
7. REFERÊNCIAS .....	53
8. ANEXO A – Parecer de aprovação pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA) .....	61
9. ANEXO B – Trabalho submetido ao The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases .....	62

GASPAROTTO, V.P.O. **Avaliação da viabilidade do Selante de Fibrina derivada de veneno de serpente como arcabouço biológico para células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos.** Botucatu, 2012. 62p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Departamento de Doenças Tropicais, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

## **RESUMO**

O estudo avaliou a viabilidade *in vitro* do biomaterial “Selante de Fibrina derivado de veneno de serpente” (SF), como arcabouço para células tronco mesenquimais (CTMs) de ratos. O SF é um material caracterizado como adesivo biológico, e foi produzido e fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, CEVAP, Brasil. As CTMs foram coletadas a partir da medula óssea de fêmures e tíbias de ratos e foram caracterizadas por meio de citometria de fluxo com auxílio de marcadores positivos: CD 44 e CD 90 (CTMs) e marcador negativo: CD 34 (células tronco hematopoiéticas). Cultivos foram induzidos para diferenciarem-se em linhagens específicas (osteogênico, condrogênico e adipogênico). Para avaliação do crescimento *in vitro* e a viabilidade celular em conjunto ao biomaterial foram utilizadas microscopia óptica de luz invertida, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. O SF em contato com as CTMs não induziu a diferenciação espontânea para as linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. As diferentes técnicas de avaliação microscópica utilizadas mostraram que o SF foi capaz de realizar a captura e manutenção das CTMs e houve interação das células com o interior e superfície do biomaterial. Portanto, a coleta, o cultivo e a caracterização das CTMs de ratos foram possíveis. O SF mostrou-se eficiente como arcabouço biológico e interagiu com as células tronco mesenquimais mantendo-as viáveis, oferecendo-se como uma ferramenta de uso clínico-cirúrgico alternativa para processos regenerativos visando terapias mais eficientes.

**Palavras-chave:** Selante de Fibrina, arcabouço biológico, veneno de serpente, células tronco mesenquimais.

GASPAROTTO, V.P.O. **Viability of Fibrin Sealant from snake venom as scaffold to rat marrow-derived mesenchymal stem cells.** Botucatu, 2012. 62p. Dissertation (Master's Degree) – Botucatu Medical School – BMS, Department of Tropical Diseases, São Paulo State University (UNESP).

## **ABSTRACT**

This study evaluated the *in vitro* viability of biomaterial Fibrin Sealant (FS) derived from snake venom as a scaffold for rat mesenchymal stem cells (MSCs). The FS is characterized as a biological adhesive material, and is produced and was supplied by the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals, CEVAP, Brazil. MSCs were collected from the bone marrow of femurs and tibias of rat and were characterized using flow cytometry with CD 44 and CD 90 positive markers (MSC) and CD34 negative marker (mononuclear stem cells). Cultivations were induced to differentiate into specific cell lineage (osteogenic, chondrogenic and adipogenic). To evaluate the *in vitro* growth and cell viability with the biomaterial were used inverted light optical microscopy, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy and transmission. The SF did not cause the spontaneous differentiation in contact with MSCs to osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineage. Different microscopy techniques showed that the SF was able to accomplish the capture and maintenance of MSCs and there was interaction with the cell interior and surface of the biomaterial. Finally, the collection, cultivation and characterization of rat MSCs were possible. The SF was effective as a biological scaffold and interacted with the MSCs keeping them viable offering itself as a tool for clinical and surgical alternative providing clinical and surgical therapies more efficient for regenerative processes.

**Key words:** Fibrin sealants, Scaffold, snake venom, mesenchymal stem cells

## 1. INTRODUÇÃO

Células que não se diferenciaram e possuem essa capacidade de se diferenciarem em uma grande variedade de tipos celulares, podem ser chamadas de células tronco<sup>1</sup>. Dessa maneira, quando um órgão ou tecido sofre alguma injúria, acredita-se que as células tronco apresentam papel regenerativo<sup>2</sup>.

Podemos citar como exemplos de células tronco: a mórula totipotente, células tronco embrionárias pluripotentes (CTEs)<sup>3</sup>, células tronco hematopoéticas (CTHs)<sup>4</sup> e células tronco mesenquimais multipotentes (CTMs)<sup>5,6</sup>. Dentro dessas categorias citadas, as CT estão amplamente distribuídas pelo organismo e são capazes de diferenciar-se em linhagens muito específicas ou apenas em fenótipos únicos<sup>7</sup>.

A medula óssea não contém somente células tronco hematopoiéticas, mas também as células tronco que podem ser definidas como mesenquimais<sup>8</sup>. As células tronco mesenquimais (CTMs), residem na medula óssea, ao redor dos vasos sanguíneos (como pericitos), na pele, gordura, músculo e outros locais<sup>7</sup>.

Descrita pela primeira vez como precursores de fibroblastos de medula óssea por Friedenstein *et al.* em 1970<sup>9</sup>, as CTMs podem ser também referidas como unidades formadoras de colônia de fibroblastos (CFU-Fs) ou células do estroma da medula<sup>10</sup>. Há evidências de que CTMs existem não só na medula óssea, mas em praticamente todos os órgãos<sup>11,12,13</sup>.

Essa terminologia original "unidades formadoras de colônia de fibroblastos (CFU-F)<sup>14,15,16</sup> tem sido gradualmente abandonada e substituída por células tronco mesenquimais (CTMs)<sup>17</sup>. Mais recentemente ainda, a Sociedade Internacional para Citoterapia sugeriu o nome de células estromais mesenquimais multipotentes<sup>18</sup>.

As CTMs surgem a partir de precursores embrionários durante o desenvolvimento fetal. Estas células tronco fetais renovam-se e geram diversas

progenitoras maduras. Células tronco fetais muitas vezes originam células tronco adultas, porém suas propriedades são diferentes. No entanto, as células tronco adultas geralmente continuam a se auto-renovar e se diferenciam em multilinhagens para manter os tecidos adultos<sup>19</sup>.

As células tronco adultas, embora sejam geralmente consideradas como tendo capacidade de diferenciação restrita em comparação as células tronco embrionárias<sup>20</sup>, têm sido o foco de grande parte das pesquisas neste campo científico<sup>21</sup>.

Enquanto as células tronco hematopoiéticas são tipicamente mantidas em cultivos de medula óssea, uma segunda população de células de medula óssea, as células tronco mesenquimais (CTMs), proliferam livremente *in vitro*<sup>22,5</sup>, submetem-se a extensiva auto-renovação e se diferenciam diversas linhagens de tecidos<sup>6</sup>.

As células tronco mesenquimais são consideradas como células tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e os órgãos parenquimatosos<sup>21,23</sup>.

Uma grande vantagem das CTMs é que estas células podem ser obtidas diretamente de cada paciente, eliminando assim as complicações associadas com a rejeição imunológica ou mesmo doenças infecciosas. No entanto, estas células tem que ser ampliadas ou manipuladas para obter uma quantidade suficiente para serem utilizadas nos tratamentos<sup>24</sup>.

Esta linhagem celular pode proliferar-se durante longos cultivos, mantendo sua indiferenciação e seu cariótipo estável e também não entram em senescência. As células tronco foram isoladas pela primeira vez, a partir de embriões de camundongo, a mais de 20 anos atrás<sup>25,26</sup>.

A multipotência das CTMs derivadas da medula óssea juntamente com o seu fácil isolamento e cultivo, assim como o alto potencial expansivo “*ex vivo*”, geraram um considerável interesse no potencial de aplicações terapêuticas dessas células em uma ampla gama de configurações, fazendo das mesmas uma ferramenta terapêutica atrativa, com amplo espectro de aplicações clínicas<sup>7,8,27</sup>. No entanto, estas células representam apenas uma pequena

porcentagem do número total de células da medula. Somente 0,01% a 0,001% das células mononucleares isoladas por gradiente de densidade dão origem a colônias de células aderentes à superfície de crescimento<sup>6</sup>.

Não existem marcadores exclusivos para definir as CTMs. Tradicionalmente, elas tem sido isoladas a partir de células mononucleares presentes na medula óssea, com base na sua adesão seletiva para superfícies plásticas<sup>28,29,30</sup>.

BADDOO *et al.* (2003)<sup>31</sup> usou uma combinação de aderência ao plástico em cultura *in vitro* para o primeiro estabelecimento de CTMs, e posteriormente, foram removidos os contaminantes de células hematopoiéticas utilizando como controle negativo os anticorpos CD45, CD34 e CD11b.

As células resultantes desta metodologia exibiram potencial de diferenciação em tecido osteogênico, adipogênico e condrogênico *in vitro* e expressaram CD29, CD44 e CD106, porém não houve expressão de marcadores de células hematopoiéticas ou células vasculares endoteliais<sup>27</sup>.

Seu uso em terapias celulares é viável, visto que atua em diversas áreas quando injetadas sistemicamente *in vivo*<sup>32</sup> e exibem uma habilidade intrínseca de migrar para locais danificados<sup>33,34,35</sup>.

CTMs possuem também potencial importante para serem utilizadas como um enxerto alogênico, evitando a necessidade da realização de colheitas de medula óssea em pacientes receptores<sup>36</sup>.

Em tecidos adultos e em desenvolvimento, vários fatores influenciam para que as células tronco mantenham seu potencial de auto-renovação e diferenciação<sup>37</sup>. Resultados de experimentos *in vitro* de cultivo em longo prazo demonstraram que o fenótipo das CTMs se mantém indiferenciado e é mantido também o seu potencial de diferenciação<sup>24</sup>.

Quando submetidas a diferentes estímulos, foram descritas como capazes de se diferenciar para linhagens osteogênica<sup>24,38</sup>, condrogênica<sup>39</sup>, adipogênica<sup>40</sup>, neurogênica<sup>41</sup> e cardiogênica<sup>36</sup>.

Com um potencial enorme de expansão *in vitro*<sup>42</sup> e a disponibilidade de grandes número de CTMs, estudos foram iniciados para caracterizar estas células e observar sua resposta a diversas moléculas bioativas.

Dessa maneira, o isolamento das CTMs e sua capacidade de diferenciação sugerem seu uso na engenharia de tecidos<sup>43</sup>. Com o desenvolvimento de materiais que promovam a união de uma variedade de fatores de crescimento e citocinas, algum dia poderá ser possível a manipulação de CTMs para promover a regeneração tecidual<sup>7</sup>.

De acordo com o conceito de engenharia de tecidos é possível regenerar vários tecidos ou órgãos utilizando-se células maduras ou células tronco semeadas em arcabouços tridimensionais apropriados<sup>44</sup>.

Atualmente, a engenharia de tecidos tem se apresentado como uma área multidisciplinar que tem por objetivos a regeneração de tecidos e a restauração da função de órgãos, pela implantação de células/tecidos expandidos fora do organismo, isto é, *in vitro*, ou pelo estímulo do crescimento celular em uma matriz implantada. O princípio geral da engenharia de tecidos envolve a combinação de células vivas com um arcabouço sintético ou natural para produzir um tecido vivo tridimensional que é funcionalmente, estruturalmente e mecanicamente igual, ou melhor, ao tecido ao qual ele foi designado a substituir<sup>45,44,46</sup>.

As CTMs utilizadas na engenharia de tecidos mostraram-se promissoras, e as estruturas de bioengenharia com um formato definido podem ser produzidas através da combinação dessas células com biomateriais adequados e fatores bioativos<sup>47</sup>.

Perspectivas futuras já estão em fase avançada de experimentação em relação à engenharia de tecidos<sup>48,49</sup>. O implante de células tronco em estruturas biodegradáveis demonstrou ser um método plausível e associado a resultados positivos *in vitro*<sup>50</sup>.

A finalidade é de evitar completamente riscos de respostas imunológicas tais como as rejeições e infecções virais, usando células autólogas. Materiais utilizados como arcabouços devem ser biocompatíveis e projetados para

atender as necessidades nutricionais e biológicas do cultivo celular associado a ele, objetivando a formação do tecido<sup>45</sup>.

Terapias celulares utilizando CTMs envolvem pelo menos três abordagens diferentes: 1º. Engenharia de tecidos: onde as CTMs são incorporadas em arcabouços 3D para a reparação ou substituição de tecidos vivos. 2º. Terapia celular de reposição: onde os defeitos genéticos podem ser curados através da substituição de células mutantes do hospedeiro por células normais do doador alogênico. 3º. Citocinas ou fatores de crescimento: onde as CTMs estimulam eventos de reparação ou inibem manifestações degenerativas<sup>46</sup>.

A vantagem do material de origem biológica está justamente na menor propensão às complicações trombóticas, além das boas características hemodinâmicas<sup>51</sup>.

Embora a abordagem típica da engenharia tecidual envolva biomateriais como arcabouços, eles também podem ser empregados como veículos de entrega de agentes terapêuticos ou proteínas, a fim de estimular a regeneração tecidual. Ao promover a interação do agente terapêutico com um biomaterial, uma ação mais prolongada pode ser alcançada<sup>48</sup>.

A estratégia clássica da engenharia de tecidos é de isolar células específicas através de uma biópsia de um paciente, cultivá-las em um arcabouço tridimensional e mantê-la no local alvo por um período suficiente que possa induzir a formação de um novo tecido e posteriormente que este biomaterial seja degradado ao longo do tempo<sup>52</sup>.

Diversos biomateriais atualmente estão disponíveis como arcabouços e podem ser classificados tanto como polímeros biológicos (colágeno tipo I ou fibronectina) e também como materiais sintéticos (hidroxiapatita, fosfato tricálcico)<sup>53,54</sup>. Implantes sintéticos osteocondutivos como os compostos cerâmicos de hidroxiapatita, fosfato tricálcico, ou ambos, têm sido amplamente utilizados por apresentarem uma estrutura porosa que facilita o crescimento ósseo, porém a falta de potencial osteoindutor constitui uma limitação<sup>55</sup>.

Um biomaterial ideal deverá apresentar algumas características essenciais: servir de suporte mecânico e biológico, os materiais e produtos de

sua degradação não deverão ser tóxicos e sua taxa de reabsorção orgânica deve coincidir com o período de formação de novos tecidos, ser poroso para que as células tenham íntima ligação com o material; permitir que moléculas bioativas tenham acesso às células; ser mecanicamente sensível ao sítio de inclusão; integrar-se perfeitamente ao novo tecido e ser absorvido sem nenhuma rejeição<sup>49,46</sup>.

Outra consideração importante para a engenharia de tecidos baseada em cultivos celulares *in vitro*, é a capacidade de controlar a diferenciação e proliferação celular. Células da medula óssea podem ser ampliadas, diferenciadas em osteoblastos e usadas como sementes para os arcabouços, apresentando uma fonte potencial de células autógenas<sup>56</sup>.

Os Selantes de Fibrina, atualmente aplicados como adesivo biológico em diversos procedimentos cirúrgicos devido às suas propriedades hemostáticas e adesivas, são excelentes biomateriais, que podem ser também utilizados como arcabouços<sup>57,58,59,60</sup>.

Os princípios biológicos dos Selantes de Fibrina são similares aos da cascata da coagulação, com a formação definitiva de um coágulo de fibrina. Várias fórmulas já foram desenvolvidas e suas diferenças vão desde a origem da fonte de fibrinogênio e de trombina para a concentração de diversos compostos. O Selante é preparado pela combinação de um concentrado de fibrinogênio e trombina, reconstituído em solução de cloreto de cálcio. O princípio da aderência é a afinidade da mistura de colágeno no momento da reação dos compostos que tendem a imitar a última fase da cascata da coagulação, por meio de fibrinogênio e ativação do fator XIII pela trombina na presença de íons cálcio. O fibrinogênio é convertido em fibrina, originando um coágulo estável e reforçado pela ativação do fator XIII, que também participa da síntese de colágeno, estimulando a proliferação de fibroblastos e contribuindo para a cicatrização dos tecidos<sup>59,61,62,63,64</sup>.

Os Selantes de Fibrina podem ser de três tipos: autólogos e homólogos, onde ambos são obtidos a partir do crioprecipitado, e o sintético ou comercial<sup>65</sup>.

BERGEL (1909)<sup>66</sup> publicou o primeiro relatório clínico sobre a utilização de compostos de fibrina, onde o uso de compostos de plasma humano para fornecer hemostasia local é conhecido desde então.

Riscos de transmissão viral existiam com casos documentados, visto que, os Selantes de Fibrina comercialmente disponíveis são sintetizados principalmente com fibrinogênio humano<sup>67,68</sup>.

Levando estas informações em consideração, em 1989 foi proposta a produção de um novo Selante de Fibrina por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Universidade Estadual Paulista – Botucatu, Brasil. Como objetivo principal, era a não utilização de sangue humano para a produção do Selante. Sendo assim, o crioprecipitado de animais de grande porte, búfalos, foi extraído e utilizado como substituto do fibrinogênio humano. THOMAZINI-SANTOS (1998)<sup>69</sup> em seu estudo comparativo entre crioprecipitados bovinos, equinos, ovinos e bubalinos, mostrou em seus resultados que bubalinos apresentam maior nível de fibrinogênio do que outras espécies de animais. Ao invés de trombina bovina, foi utilizada uma fração do complexo gioxina, um componente neurotóxico isolado a partir do veneno de *Crotalus durissus*, pertencente ao grupo das enzimas trombina-like, importante fonte de serinoproteinase<sup>67</sup>.

Este novo Selante de Fibrina produzido por pesquisadores do CEVAP permitiu o uso homólogo, heterólogo e autólogo do fibrinogênio, além da enzima trombina-like derivada do veneno de serpente ser varias vezes mais potente que a trombina bovina<sup>70</sup>.

Vários estudos têm demonstrado uma grande variedade de aplicações adicionais de Selantes de Fibrina<sup>60,71,72</sup>; para a hemostasia em pacientes com distúrbios de coagulação<sup>73</sup>; melhorar os resultados em lifts de face<sup>74</sup>; reparar defeitos dural em ressecções craniofaciais<sup>75</sup>; garantindo a hemostasia após extração dentária em pacientes anticoagulados<sup>76</sup>; fechamento de incisões após blefaroplastia<sup>77</sup>; realizando pancreaticojejunosomia<sup>78</sup>; fechamento retovaginal e outros complexos fistulais<sup>79</sup>; tratamento de pneumotórax em prematuros<sup>80</sup>; e fechando vários defeitos do septo ventricular<sup>81</sup>.

O SF tem sido utilizado ainda como veículo para outros compostos, como a liberação de antibióticos no local de uma infecção<sup>82,83,84,85</sup>; disseminar agentes quimioterápicos para as células do tumor<sup>86</sup>; entregando fator de crescimento para a cura da cartilagem<sup>87</sup>; e na endotelização de enxertos vasculares<sup>88</sup>. Estudos também têm sido publicados na indução óssea usando este selante como transportador de osso desmineralizado<sup>89</sup>.

O Selante de Fibrina é absorvido lentamente pelo sistema fibrinolítico do organismo, e sendo completamente removido pelos macrófagos dentre um período de 2 a 4 semanas<sup>83</sup>.

Dessa maneira, a possibilidade da utilização de células suspensas em Selantes de Fibrina ao invés de arcabouços sólidos comumente utilizados permite a rápida resolução dessas células em suspensão. Isto ocorre devido à rápida formação de coágulo, mesmo em fendas estreitas, prevenindo assim seu deslocamento inicial. Ainda o seu uso é altamente recomendado, pois não apresenta efeitos adversos sobre a viabilidade celular e tem se mostrado uma adequada matriz para condrogênese<sup>90</sup>.

A interação entre as células tronco mesenquimais e estes selantes têm-se apresentado como excelentes estruturas tridimensionais, oferecendo-se como importantes alternativas para o sucesso da engenharia tecidual<sup>91,92,93</sup>.

CHRISTMAN *et al.* (2004)<sup>94</sup> foram os primeiros a demonstrar a sobrevivência das células quando estas são entregues por um arcabouço injetável em comparação com técnicas terapêuticas celulares convencionais.

Ryu *et al.* (2005)<sup>95</sup> também demonstraram os efeitos benéficos de um Selante de Fibrina injetável como arcabouço para células mononucleares da medula óssea.

A possibilidade de utilização de um Selante de Fibrina, cujo fator polimerizador é derivado do veneno de serpente, abre uma importante opção clínico-cirúrgica. Apresenta vantagens aos selantes convencionais, disponíveis no mercado, a não utilização de sangue humano na sua composição; a possibilidade de formulação personalizada à necessidade da cirurgia, levando-se em conta o tempo de coagulação necessário; bem como pode se controlar o tempo de degradação do Selante. Adicionalmente, seu custo de produção é

mais baixo, visto que a tecnologia é totalmente nacional. No entanto, encontra-se em fase de Ensaios Clínicos de Fase II para seu futuro registro junto a ANVISA.

Por outro lado, o cultivo laboratorial de células tronco tem sido alvo de estudo em diferentes países, mostrando que a sua utilização em processos regenerativos é de grande relevância.

Considerando-se que o uso do Selante de Fibrina possa ser aplicado como arcabouço biológico para as células tronco mesenquimais, poderemos assim criar alternativas terapêuticas extremamente eficientes. Uma vez aplicado o Selante de Fibrina enriquecido com células tronco mesenquimais em um determinado tecido, poderemos ter a possibilidade de regeneração e diferenciação celular local extremamente aumentada. Desta maneira, podendo vir a tornar-se um grande diferencial na aplicação clínico/cirúrgico-terapêutico, evidenciando assim o aspecto biotecnológico do presente estudo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade *in vitro* do biomaterial “Selante de Fibrina derivado de veneno de serpente”, produzido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), como arcabouço para células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas a partir da medula óssea de ratos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Coletar, caracterizar e cultivar *in vitro* células tronco mesenquimais a partir da medula óssea de ratos;
- Avaliar a capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais para linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica;
- Avaliar o crescimento e a viabilidade de células tronco mesenquimais obtidas a partir da medula óssea de ratos, na presença do Selante de Fibrina;
- Verificar a adesão celular à superfície do Selante; bem como analisar o crescimento celular durante o cultivo *in vitro*;
- Verificar *in vitro* a ocorrência de diferenciação espontânea das CTMs de ratos para outras linhagens celulares na presença do Selante.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A referida pesquisa foi aprovada pela CEEA (Comissão de Ética na Experimentação Animal) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob protocolo 811/2010 e todos os processos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

#### 3.1 Obtenção do Selante de Fibrina

O Selante de Fibrina é um material caracterizado como adesivo biológico, obtido da serpente cascavel (*Crotalus durissus*) e produzido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), conforme BARROS *et al.* (2009)<sup>67</sup>.

O produto foi fornecido pelo CEVAP, fracionado em tubos do tipo “*ependorf*”, mantidos sob congelamento a -20°C. No momento do uso, esses componentes eram reconstituídos em estado líquido, originando um coágulo estável e intensa rede de fibrina.

#### 3.2 Obtenção das células tronco mesenquimais

##### 3.2.1 Animais

Foram utilizados 10 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) como doadores de medula óssea. Os animais utilizados na pesquisa eram procedentes do biotério do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) – UNESP – Botucatu.

### 3.2.2 Colheita de medula óssea de rato

Os animais foram eutanasiados com uma sobre-dose de Halotano<sup>I</sup> (CAM<sup>II</sup> > 5%) (figura 1). As coletas das medulas óssea dos fêmures e das tíbias foram realizadas pela inserção de uma seringa agulhada na cavidade do osso, e assim feita a lavagem com DMEM<sup>III</sup> alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (figuras 2 e 3).



FIGURA 1 – Animal eutanasiado com sobre dose de halotano pronto para coleta dos fêmures e tíbias.

---

<sup>I</sup> Halotano - Agente anestésico derivado alcano, largamente utilizado como anestésico inalatório.

<sup>II</sup> CAM - Concentração alveolar mínima.

<sup>III</sup> DMEM alta glicose - Gibco Laboratories (11995-065), Grand Island, NY – EUA.



FIGURA 2 – Fêmures e tíbias coletados, prontos para lavagem da cavidade óssea e coleta de medula.



FIGURA 3 – Lavagem da cavidade óssea de fêmures e tíbias e coleta de medula com DMEM.

### 3.2.3 Isolamento da fração de células mononucleares

Após a coleta da medula dos ossos, o “pool” do material referente a 4 ossos (2 fêmures e 2 tíbias por animal), foi centrifugado a 1500 RPM (340 G), durante 10 minutos para a retirada do soro e gordura. O material obtido foi ressuspensão na proporção 1/1 em meio DMEM alta glicose. Deste, foi utilizado

um volume de 4mL, sendo transferido para um tubo de 15mL, contendo 4mL de Ficoll-Paque<sup>IV</sup> densidade 1,077g/mL, e novamente centrifugado a 1500 RPM (340 G), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento, formou-se um anel (Figura 4), o qual foi coletado e então ressuspenso em 1mL de meio contendo DMEM alta glicose com 20% de soro fetal bovino (SFB)<sup>V</sup> 100UI/mL para posterior contagem em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em frascos de 25cm<sup>2</sup>, com 5mL de meio DMEM alta glicose e 20% SFB 100UI/mL contendo penicilina/estreptomicina<sup>VI</sup> 100µg/mL e anfotericina-B<sup>VII</sup> 3µg/mL (figura 5). Os frascos foram mantidos em estufa de cultivo celular a 37,5°C e uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas trocas do meio de cultivo a cada 5 dias e o acompanhamento do crescimento e aderência celular foram realizados através de microscopia óptica de luz invertida. Após a primeira troca de meio, o componente DMEM alta glicose foi substituído pelo DMEM baixa glicose<sup>VIII</sup>.

Após este período de crescimento celular e um tempo médio de 12 dias para que o cultivo atingisse 90% de confluência, foi realizada a primeira passagem celular para que houvesse a seleção da linhagem celular de interesse, assim, consequentemente aumentando o número de células tronco mesenquimais.

Para realizar a passagem, o meio de cultivo celular do frasco foi descartado e em seguida adicionados 2mL de PBS para lavagem. Posteriormente foi adicionado 2mL de TrypLE Select<sup>IX</sup> e o frasco foi mantido em estufa de cultivo celular a 37,5°C e uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 minutos. O frasco foi retirado da estufa com as células em suspensão e foi adicionado 1mL de SFB. As células em suspensão foram colocadas em um tubo de centrifuga de 15mL com 1mL de meio de cultivo completo (DMEM + 20% SFB + penicilina/estreptomicina 100µg/mL + anfotericina B 3µg/mL) e

---

<sup>IV</sup> Ficoll-Paque - Amershan Biosciences, Peapack, NJ – EUA.

<sup>V</sup> Soro Fetal Bovino - Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Av. Nações Unidas, 2343, São Paulo – SP.

<sup>VI</sup> Penicilina/Estreptomicina - Gibco Laboratories (15140), Grand Island, NY – EUA.

<sup>VII</sup> Anfotericina - Gibco Laboratories (15290), Grand Island, NY – EUA.

<sup>VIII</sup> DMEM baixa glicose - Gibco Laboratories (10567), Grand Island, NY – EUA.

<sup>IX</sup> TrypLE Select (12563-029) - Invitrogen Life Science Technologies, São Paulo – SP.

centrifugados durante 10 minutos a 1500RPM (340G), sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido.

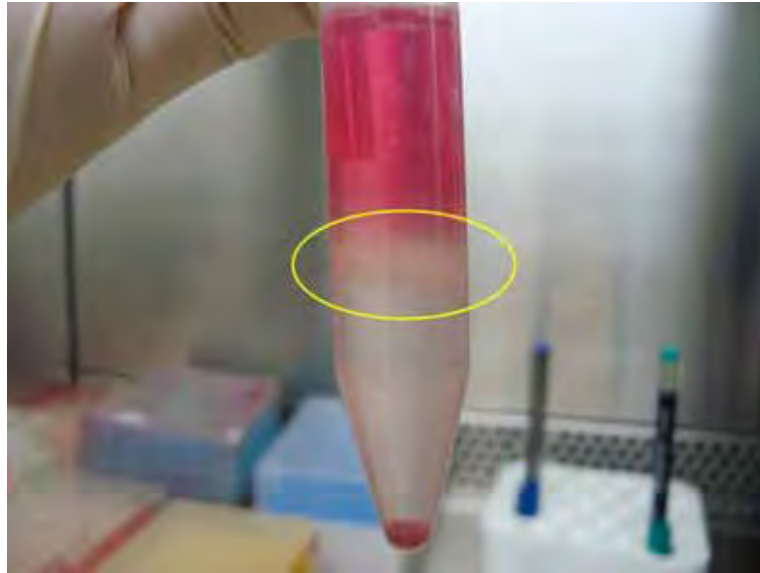


FIGURA 4 – Fração de células mononucleares separadas por diferença de densidade. Região em destaque (circulo amarelo) evidenciando o anel formado de onde serão coletadas as células para cultivo.



FIGURA 5 – Material coletado e acondicionado em frasco de cultivo celular.

### 3.3 Caracterização das células tronco

#### 3.3.1 Células tronco mesenquimais

As CTMs provenientes do cultivo de primeira passagem foram caracterizadas com marcadores de superfícies, a fim de avaliar durante o cultivo a proporção entre células tronco mesenquimais e células tronco hematopoiéticas. A leitura dos resultados foi feita através de citometria de fluxo (FACS Calibur – BD) – Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os marcadores utilizados foram:

- Marcador positivo: CD44<sup>X</sup> e CD90<sup>XI</sup>
- Marcador negativo: CD34<sup>XII</sup>

Para a realização da marcação, foi realizado um ajuste para que a suspensão celular tivesse  $1 \times 10^3$  células para cada teste realizado. As células foram distribuídas em 5 tubos (Falcon BD® 352054), onde um tubo continha somente células (controle), um tubo contendo células mais anticorpo secundário (controle), e os outros 3 tubos contendo as células mais o CD44, CD90 e o CD34. Os anticorpos CD44, CD90 e CD34 foram adicionados a uma diluição de 1:10 e era aguardado um tempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Após a adição dos anticorpos foi adicionado 1mL de PBS para lavagem das células as quais foram centrifugados a 2000 RPM (620G) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 1mL de PBS. Como o marcador CD44 não é conjugado a um anticorpo secundário, foi então adicionado no tubo do CD44 um anticorpo secundário, aguardado por 30 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1mL de PBS. Em seguida os tubos foram lidos em citômetro de fluxo.

---

<sup>X</sup> CD44 HCAM (OX50) FITC - Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2145 Delaware Avenue, CA. 95060 U.S.A.

<sup>XI</sup> CD90 Mouse Anti-Rat FITC - Gibco Laboratories, Grand Island, NY – EUA.

<sup>XII</sup> CD34 Mouse Anti-Human FITC - BD Pharmingen 10975 Torreyana Road San Diego, CA 92121

### 3.4 Diferenciação celular

Para avaliar a diferenciação das células tronco mesenquimais foi testado a capacidade que tais células têm em se diferenciar em tecido osteogênico, condrogênico e adipogênico. Para a diferenciação em tecido adipogênico foi utilizado o Kit StemPro Adipogenesis Differentiation – Invitrogen<sup>XIII</sup>; para a diferenciação em tecido condrogênico foi utilizado o Kit StemPro Chondrogenesis Differentiation – Invitrogen<sup>XIV</sup> e para a diferenciação em tecido osteogênico foi utilizado o Kit StemPro Osteogenesis Differentiation – Invitrogen<sup>XV</sup>. O protocolo empregado seguiu as orientações dos fabricantes.

#### 3.4.1 Diferenciação para linhagem adipogênica

As células tronco provenientes dos frascos de cultivo celular de primeira passagem foram ressuspensas e transferidas para uma placa de cultivo de 6 poços contendo meio de cultivo completo e cultivadas em estufa de cultivo celular a 37,5°C e uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até que atingissem 70% de confluência antes de iniciar o teste de diferenciação.

Quando o cultivo celular atingiu a confluência esperada, o meio de cultivo completo foi trocado pelo meio de diferenciação específico contendo 90% de StemPro Adipocyte Differentiation Basal Medium, 10% de StemPro Adipogenesis Supplement, penicilina/estreptomicina 100µg/mL e anfotericina B 3µg/mL. O meio indutor foi trocado a cada 3 dias durante 7 dias de diferenciação. Após este procedimento, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e água destilada e em seguida adicionado 2mL de Oil Red-O Solution. As células foram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente, após foi removido o corante, lavou-se 3 vezes com água destilada. Em seguida adicionou-se 2mL de solução de Hematoxilina durante 15 minutos para marcação do núcleo. Os poços foram

---

<sup>XIII</sup> StemPro Adipogenesis (A1007001) - Invitrogen Life Science Technologies, São Paulo – SP.

<sup>XIV</sup> StemPro Chondrogenesis (A1007101) - Invitrogen Life Science Technologies, São Paulo – SP.

<sup>XV</sup> StemPro Osteogenesis (A1007201) - Invitrogen Life Science Technologies, São Paulo – SP.

lavados com água destilada novamente e os campos foram observados com auxílio de um microscópio óptico de luz invertida.

#### *3.4.2 Diferenciação para linhagem condrogênica*

Células tronco provenientes dos frascos de cultivo celular de primeira passagem foram ressuspensas e transferidas para uma placa de cultivo de 6 poços contendo meio de cultivo completo e cultivadas em estufa de cultivo celular a 37,5°C e uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até que atingissem 70% de confluência antes de iniciar o teste de diferenciação.

Quando o cultivo celular atingiu a confluência esperada, o meio de cultivo completo foi trocado pelo meio de diferenciação específico contendo 90% de StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 10% de StemPro Chondrogenesis Supplement, penicilina/estreptomicina 100µg/mL e anfotericina B 3µg/mL. O meio indutor foi trocado a cada 3 dias durante 16 dias de diferenciação. Após este procedimento, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e em seguida adicionado 2mL de Alcian Blue 1% preparada em 0,1%N HCL. As células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, após foi removido o corante, lavou-se 3 vezes com 0,1%N HCL e os campos foram observados com auxílio de um microscópio óptico de luz invertida.

#### *3.4.3 Diferenciação para linhagem osteogênica*

Células tronco provenientes dos frascos de cultivo celular de primeira passagem foram ressuspensas e transferidas para uma placa de cultivo de 6 poços contendo meio de cultivo completo e cultivadas em estufa de cultivo celular a 37,5°C e uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até que atingissem 70% de confluência antes de iniciar o teste de diferenciação.

Quando o cultivo celular atingiu a confluência esperada, 70%, o meio de cultivo completo foi trocado pelo meio de diferenciação específico contendo 90% de StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 10% de StemPro Osteogenesis Supplement, penicilina/estreptomicina 100µg/mL e

Anfotericina B 3µg/mL. O meio indutor foi trocado a cada 3 dias durante os 10 dias do estudo de diferenciação. Após este procedimento, as células foram fixadas em álcool 70%, lavadas com água destilada e em seguida adicionado 2mL de Alizarin Red. As células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, após foi removido o corante, lavou-se 4 vezes com água e os campos foram observados com auxílio de um microscópio óptico de luz invertida.

### **3.5 Diferenciação espontânea das CTMs *in vitro* com a presença do biomaterial**

Após 20 dias de crescimento das CTMs na presença do biomaterial, foi estabelecida a capacidade de indução espontânea de diferenciação das células na presença do Selante. Para tanto foram utilizados marcadores específicos para linhagens celulares osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas de acordo com o descrito no item 3.4.

### **3.6 Associação do Selante com as células tronco**

#### *3.6.1 Preparo e cultivo do biomaterial*

As amostras do Selante, 8µL, foram acondicionadas em placas de cultivo de 6 poços onde foi adicionado em média  $3,20 \times 10^5$  de células tronco mesenquimais de ratos já cultivadas e caracterizadas previamente, seguidos da adição de meio de cultivo completo. As placas foram mantidas em estufa de cultivo celular a 37,5°C e uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas trocas do meio de cultivo a cada 5 dias para se obter crescimento e agregação celular ao biomaterial.

### **3.7 Avaliação *in vitro* do crescimento e viabilidade celular junto ao biomaterial**

#### *3.7.1 Microscopia óptica de luz invertida*

O crescimento das CTMs nas placas foi avaliado em cultivo de primeira passagem por microscopia óptica de luz invertida. Foram plaqueadas uma média de  $2,13 \times 10^3$  células para 8 $\mu$ L de biomaterial em 5 mL de meio de cultivo completo. A densidade celular foi avaliada com a contagem das células com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As células foram marcadas com Tripán Blue<sup>XVI</sup> (Benzamine blue), colocadas em uma câmara de Neubauer e então levadas a um microscópio de luz para a realização da contagem celular.

#### *3.7.2 Microscopia de fluorescência*

As células em crescimento sobre o biomaterial foram avaliadas quanto ao crescimento e a viabilidade pela marcação das células com a utilização de sondas fluorescentes. As células foram marcadas com Hoescht 33342<sup>XVII</sup> que marca as células em azul (vivas) e com Iodeto de Propidium<sup>XVIII</sup> que marca as células em vermelho (mortas).

O meio da placa de cultivo celular primário de CTMs associado ao Selante de Fibrina foi removido e acrescentado 0,5mL de PBS juntamente com 20 $\mu$ L de solução de Hoescht 33342 10mg/mL durante 10 minutos. Após este período, descartou-se o PBS juntamente com a solução de Hoescht e as células foram lavadas com PBS puro. Foi adicionado 5 $\mu$ L de solução de Iodeto de Propidium 1mg/mL e aguardado 5 minutos e realizado novamente uma lavagem com PBS antes de executar a leitura.

---

<sup>XVI</sup> Alfa Aesar GmbH & Co.KG Zeppelinstrasse 7 D-76185 Karlsruhe / Germany

<sup>XVII</sup> Bisbenzimidazole H 33342 - Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Av. Nações Unidas, 2343, São Paulo – SP.

<sup>XVIII</sup> Propidium iodide - Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Av. Nações Unidas, 2343, São Paulo – SP.

A leitura das células marcada com as sondas fluorescentes foi realizada com o auxílio de um microscópio de fluorescência (filtro azul, excitação: 450 a 490nm).

### 3.7.3 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras do Selante, 8 $\mu$ L, juntamente as células tronco mesenquimais de ratos foram avaliadas quanto a sua forma, contorno e topografia de sua superfície através da microscopia eletrônica de varredura.

Para tanto, as amostras do Selante foram cultivadas juntamente com as células tronco mesenquimais e fixadas em fixador de Karnovsky, referente à solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3 por 24h.

Após obter as amostras fixadas, foram feitos os seguintes passos para adequar o material para a realização da microscopia eletrônica de varredura:

- Lavagem em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3 (3x de 5 minutos);
- Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% diluído no mesmo tampão (3h);
- Desidratação em álcool etílico em seqüência crescente até concentração final de 100%, passando da concentração de 70% diretamente para álcool absoluto (repetindo 3 vezes);
- Secagem em aparelho de ponto crítico CPD030 com CO<sub>2</sub> líquido;
- Montagem dos materiais em suportes “*stubs*” apropriados;
- Metalização em Sputter SCD050 para proceder a cobertura com ouro.

As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL – JSM5800LV, com voltagem de 10 kV e documentadas por fotografia digital no próprio aparelho.

### 3.7.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras do Selante juntamente com as células tronco mesenquimais de ratos foram avaliadas principalmente quanto as suas características morfológicas e estruturais através da microscopia eletrônica de transmissão.

Para tanto, as amostras do Selante foram cultivadas juntamente com as células tronco mesenquimais e fixadas em fixador de Karnovsky, referente à solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3 por 24h.

Após obter as amostras fixadas, foram feitos os seguintes passos para adequar o material para a realização da microscopia eletrônica de transmissão:

- Lavagem em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3 (3x de 5 minutos);
- Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% diluído no mesmo tampão (3h);
- Desidratação em álcool etílico em seqüência crescente até concentração final de 100%;
- Imersão em acetona (1h);
- Imersão em acetona + resina (2:1) (12h);
- Imersão em acetona + resina (1:1) (12h);
- Inclusão em resina Durcupan® ACM Fluka<sup>XIX</sup> sendo a polimerização completa em estufa a 50°C durante 48h;
- Trimagem realizada com auxílio de lamina apropriada;
- Cortes semi-finos (0,3µm) realizados com navalha de vidro e corados com Azul de Toluidina 1% em placa aquecedora;
- Cortes ultra-finos (50nm) realizados com navalha de diamante e corados com Manila + Citrato de Chumbo.

As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão TECNAI BIOTWEEN G2 SPIRIT, marca FEI COMPANY, com voltagem de 80 kV e documentadas por fotografia digital no próprio aparelho.

Tanto a microscopia eletrônica de varredura como a microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, com apoio do Laboratório de Regeneração Nervosa, localizado no Departamento de Anatomia e Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia.

---

<sup>XIX</sup> Durcupan® ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Selante de Fibrina

Após aproximadamente 2 minutos da reconstituição de seus componentes em temperatura ambiente, o material começou a apresentar intensa formação da rede de fibrina, tendo como resultado final o aparecimento de um coágulo estável (figuras 6 e 7).

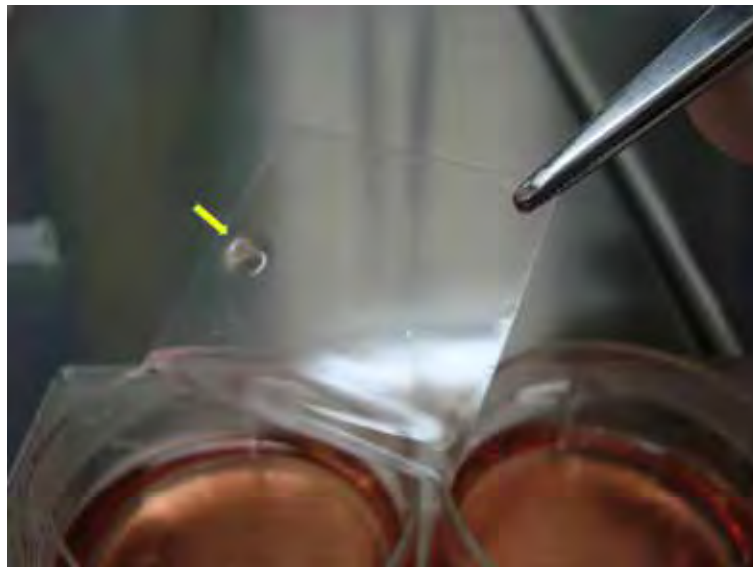


FIGURA 6 – Formação do coágulo de fibrina (seta amarela), após a união dos componentes do Selante de Fibrina.

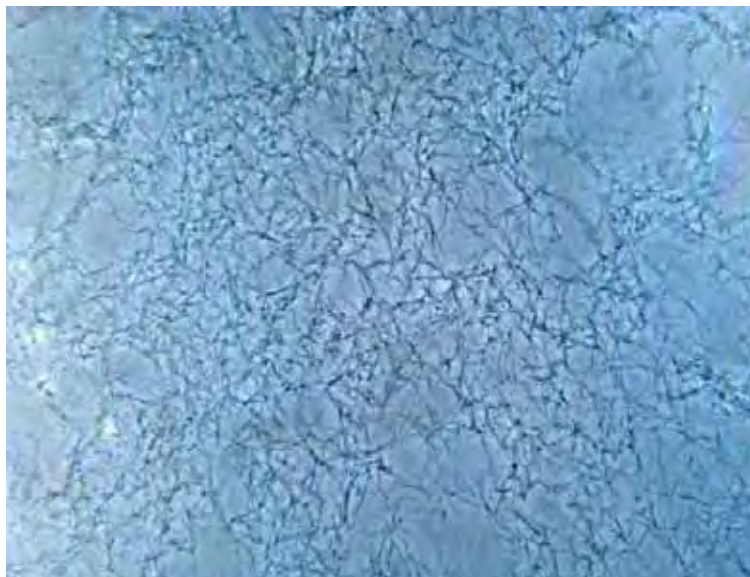


FIGURA 7 – Aspecto da rede de fibrina característica formada pelo Selante de Fibrina produzido pelo CEVAP. MO (100X).

#### **4.2 Isolamento e caracterização das células tronco mesenquimais**

As células obtidas pelo cultivo primário proveniente da região onde houve a formação do anel e concentração da fração de células tronco mononucleares da medula óssea dos ratos apresentaram morfologia fibroblastóide (figura 8). As CTMs apresentaram a capacidade de aderência ao plástico, sendo que a partir da primeira passagem, elas correspondiam a praticamente 80% das células obtidas. Essas observações foram indicativas de que se tratavam de CTMs, sendo confirmado posteriormente com a marcação pelos anticorpos CD44, CD90 e CD34.

Os cultivos realizados levaram aproximadamente 12 dias para atingirem a confluência de 90% e não houve diferença do tempo de crescimento celular quando comparado com a presença do biomaterial.

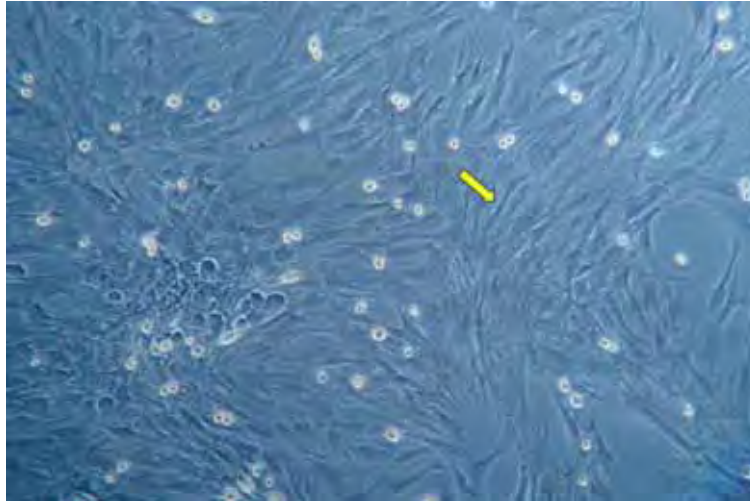


FIGURA 8 – Morfologia fibroblastóide (seta amarela) característica das CTMs, observadas em microscopia óptica de luz invertida. MO (200X).

O número total de células da fração mononuclear isoladas em cada amostra variou de  $5,33 \times 10^6$  a  $10,20 \times 10^6$  células. A média de células por mL foi de  $1,93 \times 10^6$ . Os resultados estão presentes na tabela 1.

TABELA 1 – Volume de medula óssea mais meio de coleta, coletada a partir dos fêmures e tíbias de ratos, número de células isoladas da fração mononuclear, número de células por mL e número de células na primeira passagem por amostra.

AMOSTRA (MEDULA ÓSSEA)	VOLUME COLETADO (mL)	CÉLULAS ISOLADAS POR COLETA	CÉLULAS (nº cels/mL)	Nº TOTAL DE CÉLULAS NA PRIMEIRA PASSAGEM
1	4	9.060.000	2.265.000	805.000
2	4	10.200.000	2.550.000	645.000
3	4	8.265.000	2.066.250	715.000
4	4	6.245.000	1.561.250	480.000
5	4	8.975.000	2.243.750	510.000
6	4	6.075.000	1.518.750	575.000
7	4	5.335.000	1.333.750	665.000
8	4	9.810.000	2.452.500	685.000
9	4	8.070.000	2.017.500	535.000
10	4	5.525.000	1.381.250	800.000
MÉDIA	4	7.756.000	1.939.000	641.500

#### 4.2.1 Citometria de fluxo

Para a caracterização das células tronco mesenquimais, foram utilizados marcadores de superfície positivos CD44 e CD90 (células tronco mesenquimais) e negativo CD34 (células tronco hematopoiéticas).

A marcação foi realizada em cultivo de primeira passagem. Os resultados provenientes da citometria de fluxo revelaram-se com baixa marcação para o marcador CD34 (figura 9), apenas 1,36% do total de células presentes na amostra foram marcadas; alta marcação para os marcadores CD44 (figura 10), 81,93% de células marcadas, e CD90 (figura 11), 89,06% de células marcadas.

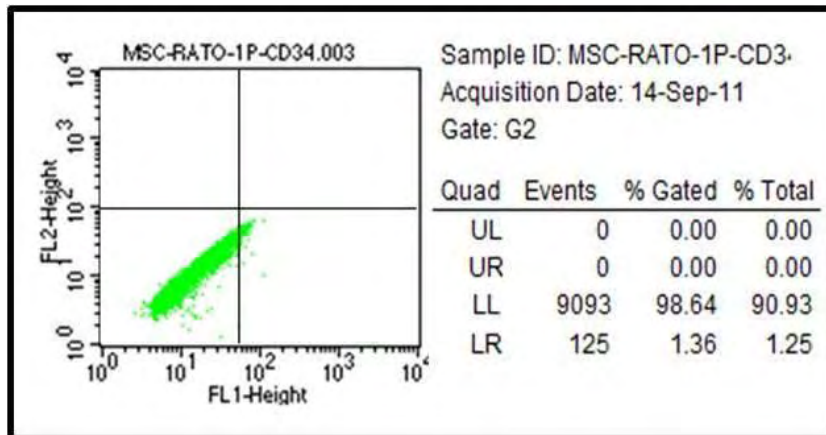


FIGURA 9 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de primeira passagem revelando baixa marcação para o marcador CD34

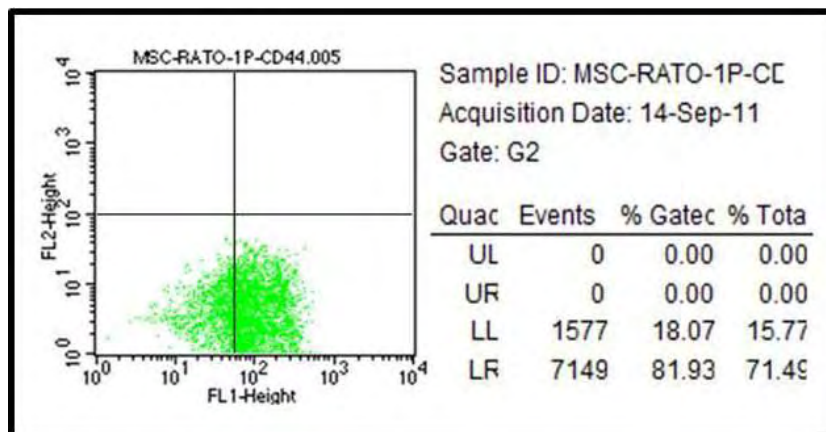


FIGURA 10 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de primeira passagem revelando alta marcação para o marcador CD44.

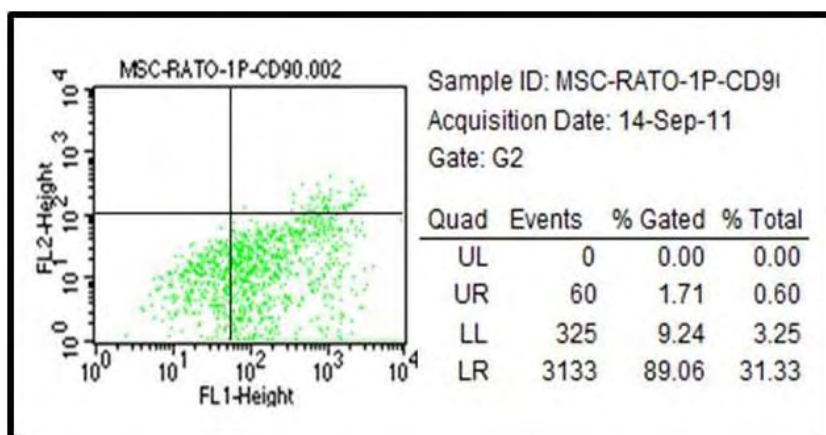


FIGURA 11 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de primeira passagem revelando alta marcação para o marcador CD90.

### 4.3 Diferenciação e marcação para linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica

#### 4.3.1 Diferenciação para linhagem adipogênica

Formada a cultura de CTMs, o cultivo de primeira passagem foi induzido para diferenciar-se em linhagem adipogênica. Após 7 dias em meio de cultivo específico, ficou aparente a presença de vacúolos ricos em lipídeos no interior das células. Sendo assim, o cultivo foi fixado e realizado a coloração por Oil Red-O Solution, visando à marcação da deposição de lipídeos (figura 12).

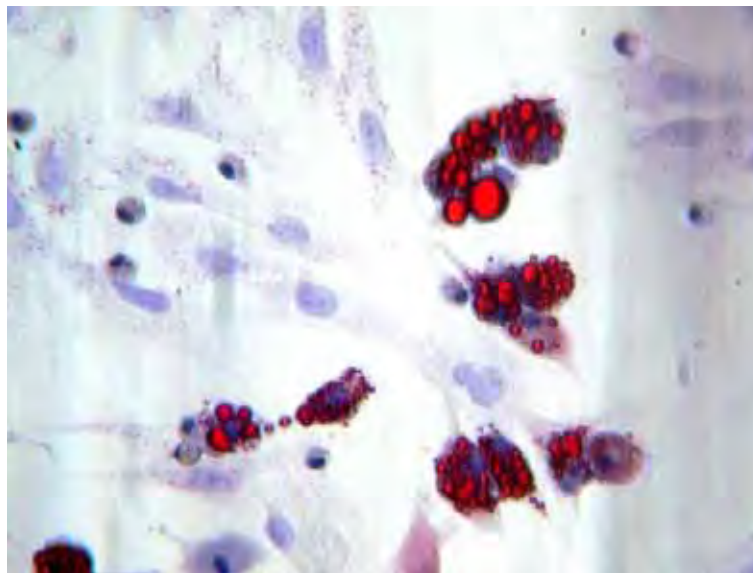


FIGURA 12 – Coloração das células com Oil Red-O Solution indicando a presença de gotas ricas em lipídeos no interior das células. MO (400X).

#### 4.3.2 Diferenciação para linhagem condrogênica

Depois de constituída a cultura das CTMs, o cultivo de primeira passagem foi induzido a diferenciar-se em linhagem condrogênica. Após 16 dias em meio específico para indução da diferenciação para condrócitos ficou aparente a mudança morfológica das células em relação ao controle. Sendo assim, as células foram fixadas e coradas com solução de Alcian Blue visando à marcação dos proteoglicanos produzidos pelos condrócitos. A coloração específica foi positiva, indicando que houve a diferenciação das CTMs para condrócitos (figura 13).

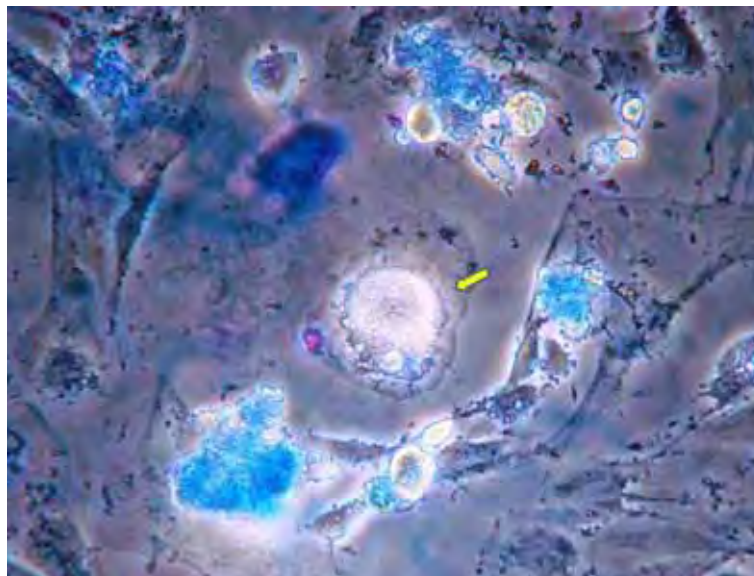


FIGURA 13 – Coloração Alcian Blue indicando a presença de proteoglicanos produzidos pelos condrócitos. Célula em processo de diferenciação (seta amarela). MO (400X).

#### 4.3.3 Diferenciação para linhagem osteogênica

Estabelecida a cultura de CTMs, o cultivo de primeira passagem foi induzido para diferenciar-se em linhagem osteogênica. Após 10 dias em meio de cultivo específico, ficou aparente a deposição de cálcio pelos osteócitos. Sendo assim, o cultivo foi fixado e realizado a coloração por solução de Alizarin Red, visando à marcação da deposição dos minerais no meio extracelular (figura 14).

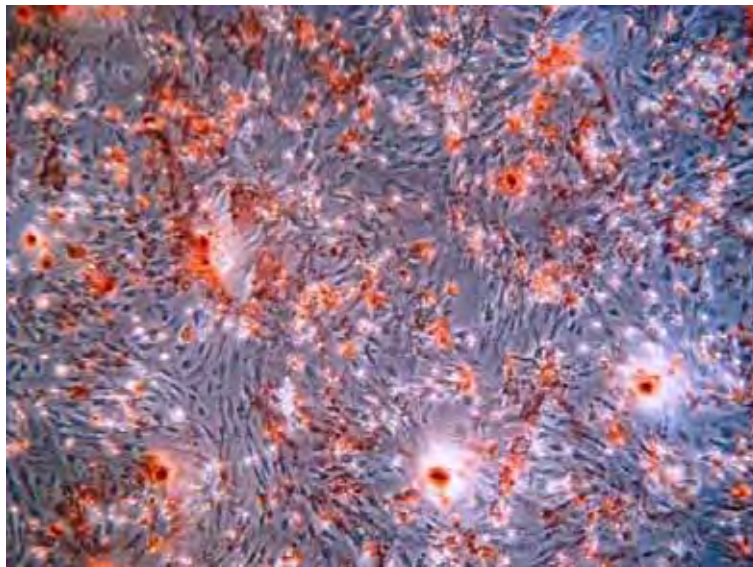


FIGURA 14 – Coloração Alizarin Red indicando a deposição de cálcio realizada pelos osteócitos no meio extracelular. MO (200X).

#### 4.4 Avaliação da diferenciação espontânea das CTMs *in vitro* com a presença do biomaterial

##### 4.4.1 Diferenciação espontânea para linhagem adipogênica

Após 7 dias em cultivo, as CTMs na presença do Selante de Fibrina foram marcadas pelo corante Oil Red-O Solution visando à marcação da deposição de lipídeos no interior das células. Não houve marcação significativa de lipídeos intracelulares, sendo indicativo que o biomaterial não foi capaz de induzir as CTMs a diferenciarem-se para linhagem adipogênica apenas em sua presença (figura 15).

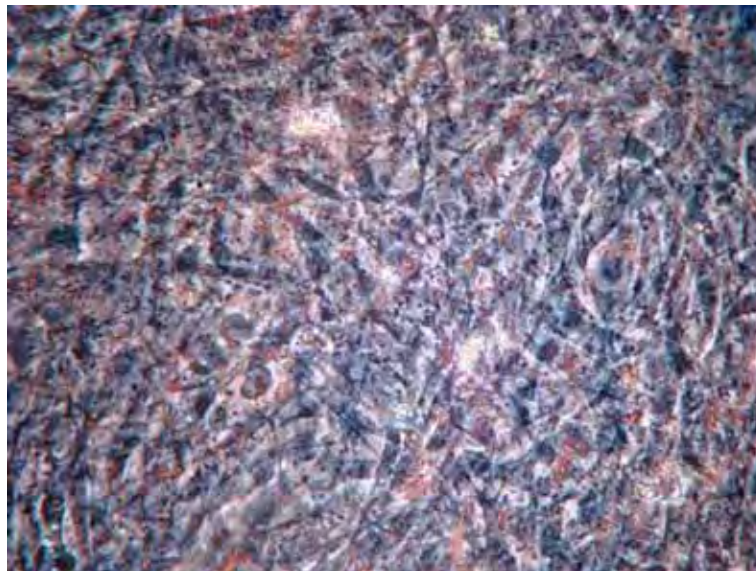


FIGURA 15 – Coloração das células com Oil Red-O Solution indicando a ausência de significativa marcação para este corante. MO (200X).

#### 4.4.2 Diferenciação espontânea para linhagem condrogênica

Após 16 dias em cultivo, as CTMs na presença do Selante de Fibrina foram marcadas pelo corante Alcian Blue visando à marcação de proteoglicanos produzidos pelos condrócitos. Não houve marcação expressiva nas células em cultivo, indicando que o biomaterial não foi capaz de induzir as CTMs a diferenciarem-se para linhagem condrogênica apenas em sua presença (figura 16).

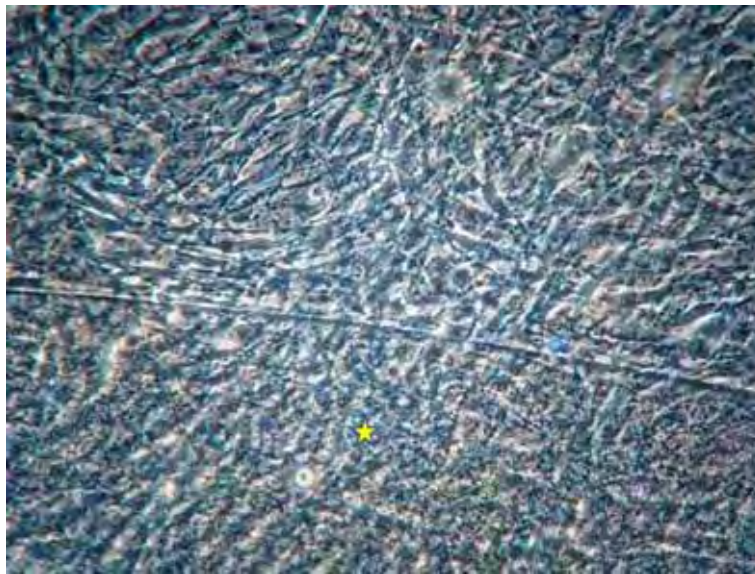


FIGURA 16 – Região do biomaterial (estrela amarela). Não houve marcação para o corante Alcian Blue. MO (200X).

#### 4.4.3 Diferenciação espontânea para linhagem osteogênica

Após 10 dias em cultivo, as CTMs na presença do Selante de Fibrina foram marcadas pelo corante Alizarin Red visando à marcação da deposição de minerais no meio extracelular pelos osteócitos. Foi observado marcação com pouca intensidade (figura 17).

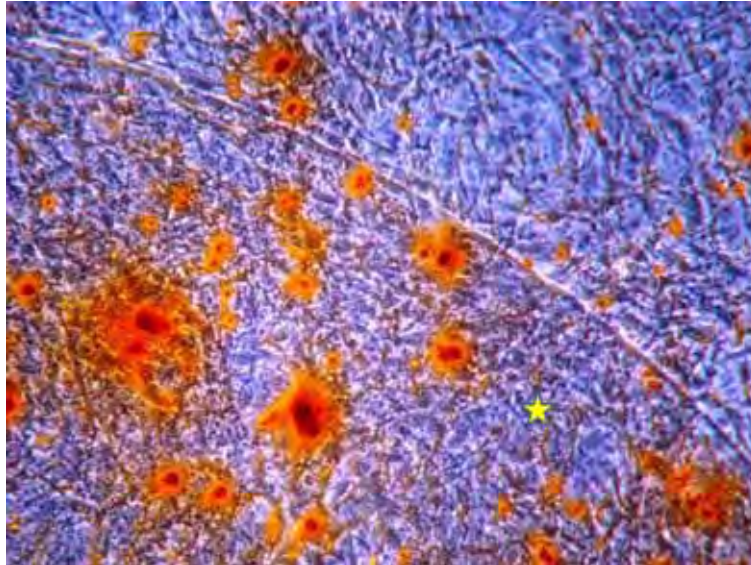


FIGURA 17 – Marcação relevante pelo corante Alizarin Red na presença do Selante de Fibrina. Região do biomaterial (estrela amarela). MO (200X).

### 4.5 Avaliação *in vitro* do crescimento e viabilidade celular junto ao biomaterial

#### 4.5.1 Avaliação por microscopia óptica de luz invertida

Após a mudança do cultivo primário para primeira passagem, foi realizada a união do Selante de Fibrina com as CTMs. No segundo dia de cultivo foi possível observar a proliferação de células com morfologia fibroblastóide, inclusive ao redor do biomaterial. A confluência celular neste período era em torno de 30 a 40% (figuras 18 e 19).

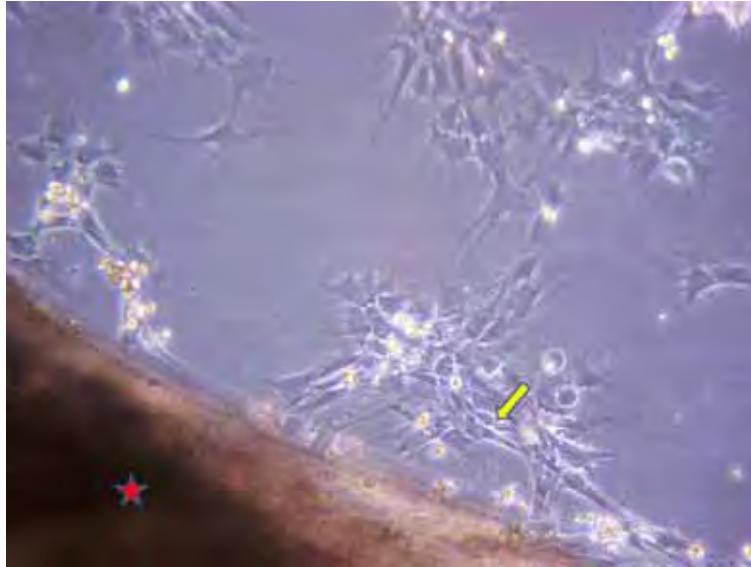


FIGURA 18 – Selante de Fibrina (estrela vermelha) e presença das CTMs após 2 dias de cultivo com morfologia fibroblastóide (seta amarela). MO (200X).

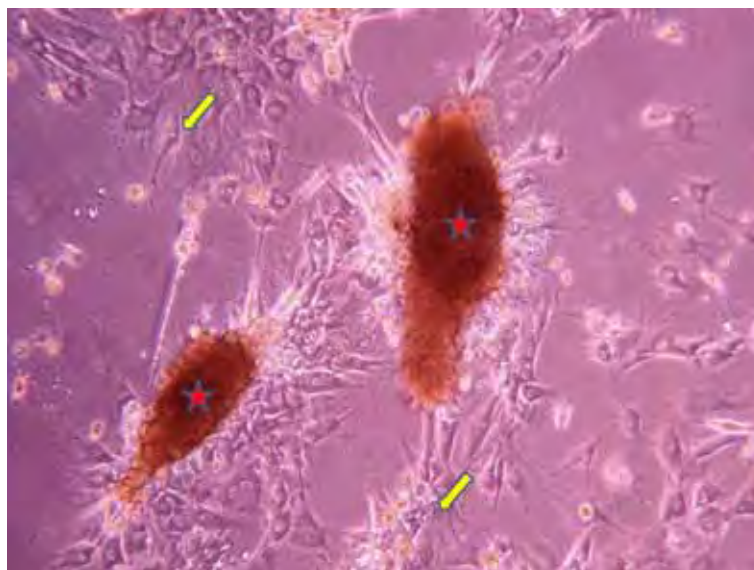


FIGURA 19 – Fragmentos de Selante de Fibrina (estrelas vermelhas) e proliferação celular ao redor do biomaterial (setas amarelas). MO (200X).

Aos quatro dias de cultivo o aumento e proliferação celular foram consideravelmente bons, mantendo sua morfologia característica e definindo muito bem o que era o Selante e o que eram as CTMs (figura 20). O cultivo apresentava confluência celular em torno de 60 a 70%. Em algumas regiões foi

possível observar a rede de fibrina formada pelo Selante, evidenciando um aspecto de “teia de aranha” (figura 21), onde em alguns momentos as células foram capturadas pela rede de fibrina (figura 22).

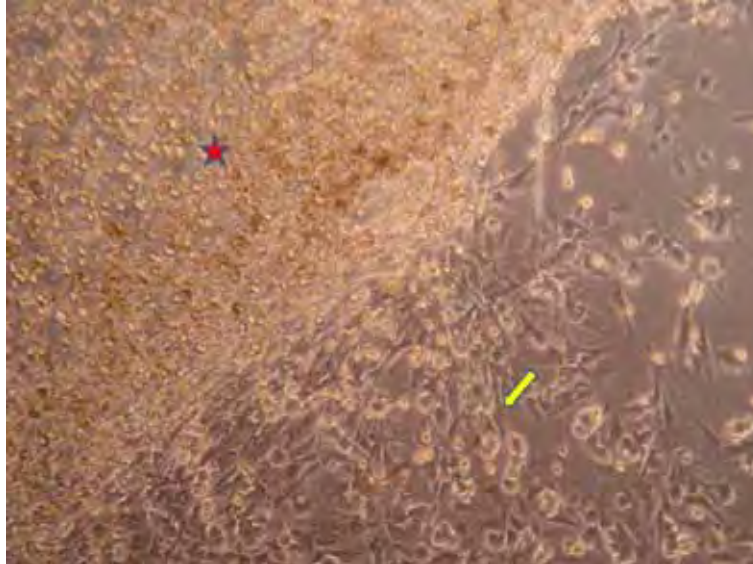


FIGURA 20 – Região do Selante de Fibrina (estrela vermelha) e proliferação das CTMs com confluência ao redor de 60% (seta amarela). MO (200X).

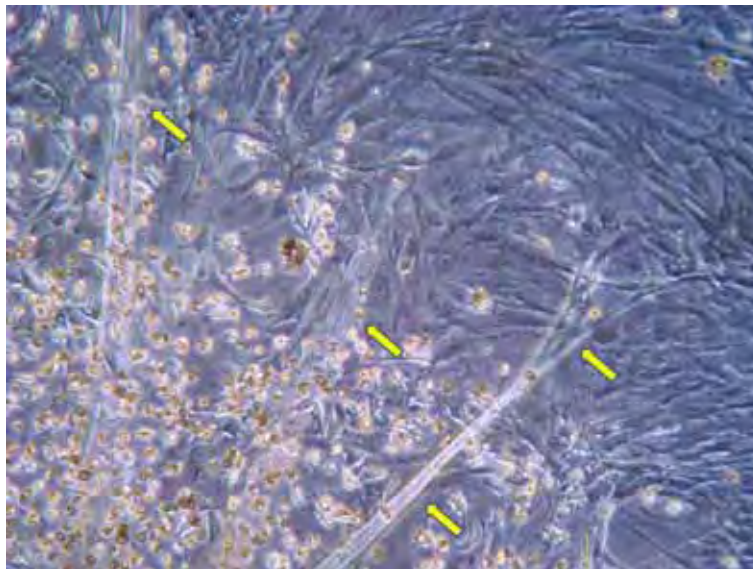


FIGURA 21 – Rede de fibrina com aspecto de “teia de aranha” (setas amarelas). MO (200X).



FIGURA 22 – Células capturadas pela rede de fibrina (setas amarelas). MO (200X).

Depois de oito dias de cultivo a confluência celular do cultivo era em torno de 90% e algumas das CTMs pareciam estar crescendo aderidas as superfícies do Selante (figura 23).



FIGURA 23 – CTMs projetando-se em direção a superfície do biomaterial (setas amarelas). MO (200X).

#### 4.5.2 Avaliação por microscopia de fluorescência

As células viáveis apresentaram-se com o núcleo marcado pela solução de Hoescht 33342, que apresentavam coloração azul brilhante. Células com a membrana lesada foram marcadas pela solução de Iodeto de Propidium e possuíam coloração vermelha. Foi possível observar a viabilidade do cultivo células, acima de 75% de CTMs vivas na presença do Selante de Fibrina (figura 24).

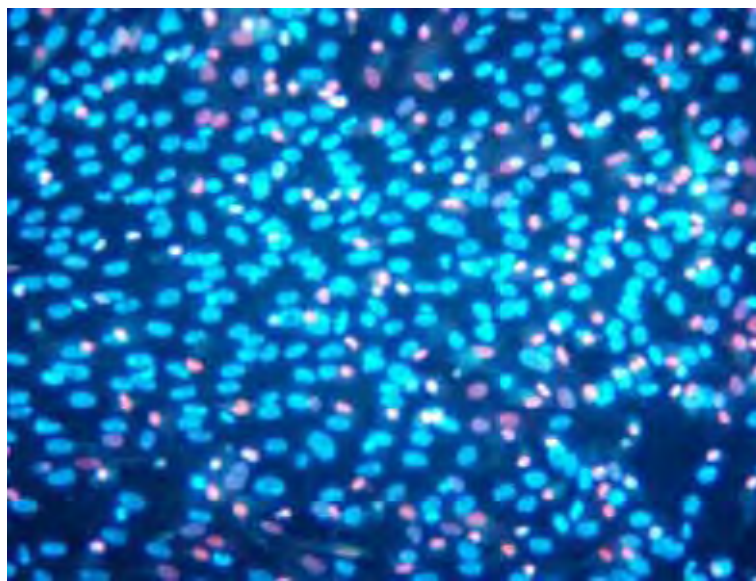


FIGURA 24 – Coloração de Hoescht 33342 e Iodeto de Propidium para análise da viabilidade celular de CTMs cultivadas na presença do Selante de Fibrina. MF (200X).

#### 4.5.3 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura

Em relação a análise tridimensional apenas do Selante de Fibrina pela microscopia eletrônica de varredura, revelou uma superfície uniforme, formando um “tapete” constituído basicamente por uma intensa rede de fibrina (figuras 25 e 26).

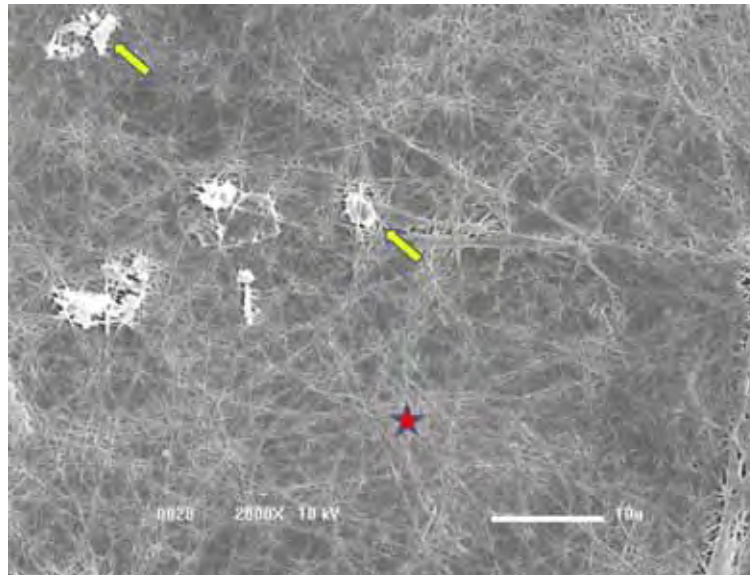


FIGURA 25 – Ultra-estrutura de amostra do Selante de Fibrina à microscopia eletrônica de varredura. Presença de alguns grânulos de cálcio referente a solução de cloreto de cálcio onde o material é reconstituído (setas amarelas). Superfície do “tapete” formado pela intensa rede de fibrina (estrela vermelha). MEV (2000X).

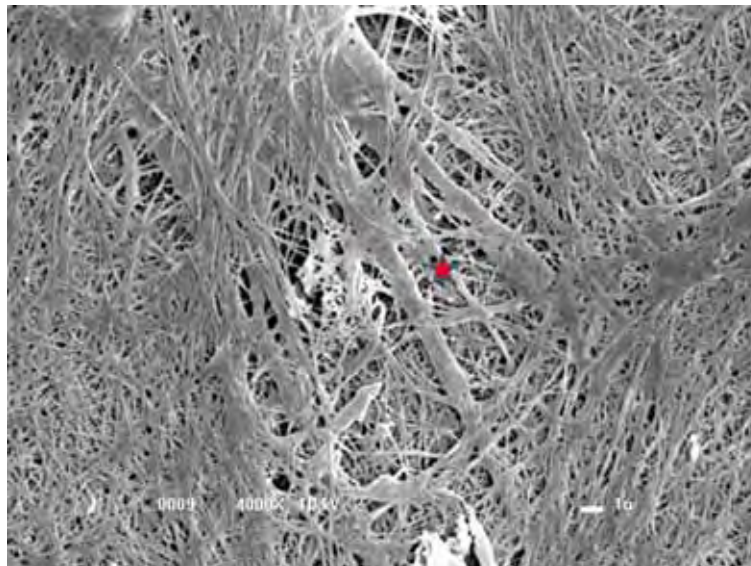


FIGURA 26 – Em maior aumento pode-se observar a intensa rede de fibrina formada (estrela vermelha) pelo Selante de Fibrina. MEV (4000X).

A microscopia eletrônica de varredura realizada no biomaterial cultivado por 8 dias na presença de células tronco mesenquimais, revelaram a capacidade do Selante de Fibrina em capturar e promover a adesão celular em sua superfície (figura 27). Em maior aumento, foi possível observar a interação celular com células adjacentes e prolongamentos celulares em direção ao interior do biomaterial (figuras 28 e 29).

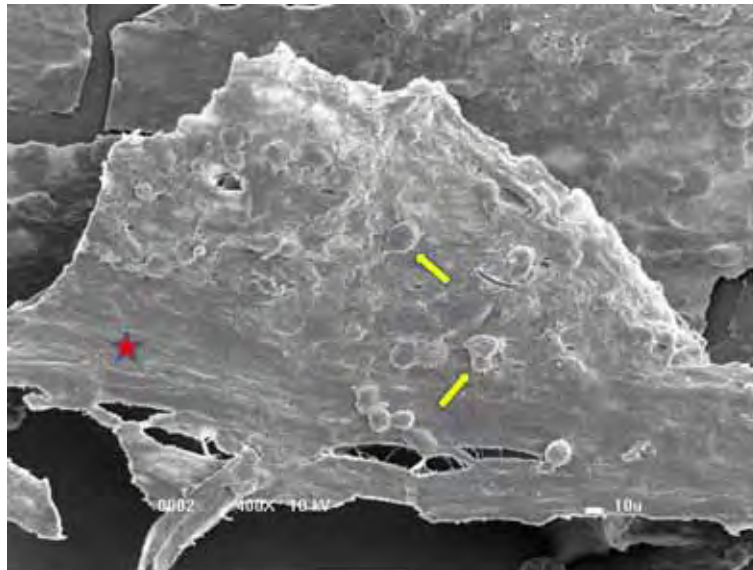


FIGURA 27 – “Tapete” formado pelo Selante de Fibrina (estrela vermelha) e a presença de grande quantidade de CTMs aderidas a superfície do biomaterial (setas amarelas). MEV (400X).

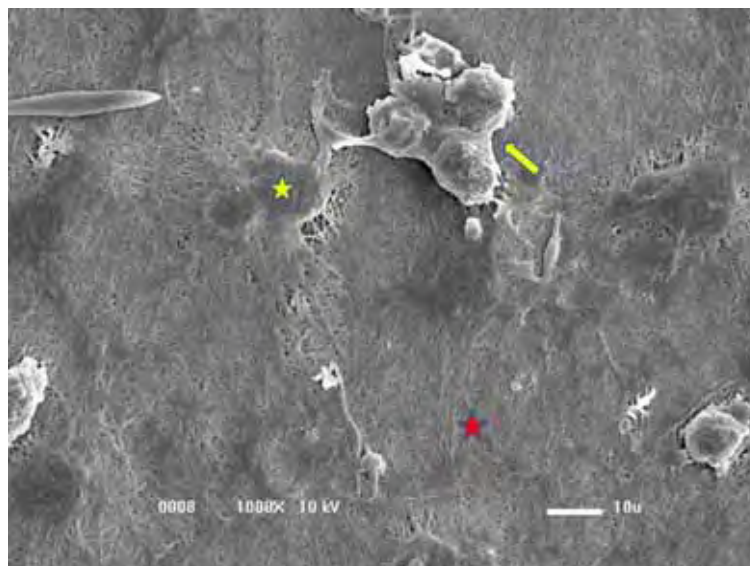


FIGURA 28 – Intensa rede de fibrina formada (estrela vermelha). Interação e crescimento celular na superfície do biomaterial (seta amarela). CTMs capturadas e recobertas pela rede de fibrina (estrela amarela). MEV (1000X).

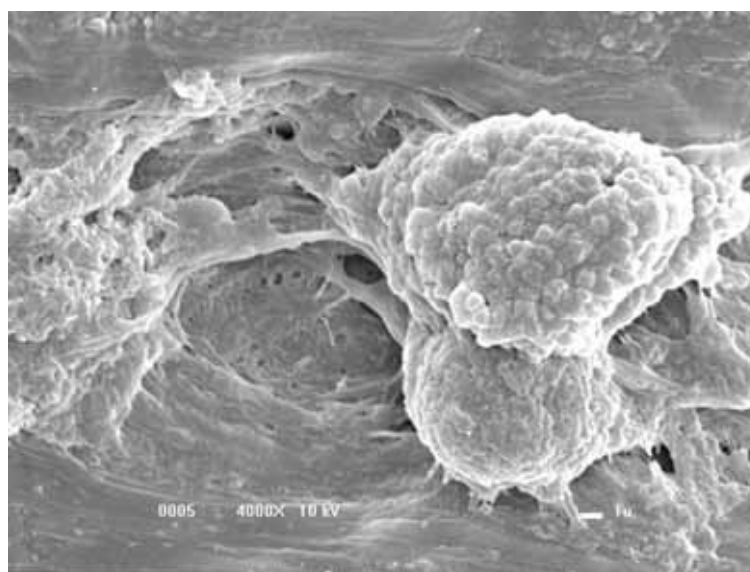


FIGURA 29 – Prolongamentos celulares em direção ao interior do biomaterial após 8 dias de cultivo celular. MEV (4000X).

#### 4.5.4 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão

Analisando as imagens realizadas do Selante de Fibrina cultivado durante 8 dias na presença das CTMs foi possível notar a presença de projeções celulares onde houve a formação de inúmeras camadas. Também se

pode notar a presença do núcleo celular, da matriz depositada, possivelmente a matriz de fibrina original, e de estruturas circulares eletrodensas caracterizadas como sendo mitocôndrias (figuras 30 e 31). Dessa maneira, as imagens mostraram a íntima ligação que ocorreu entre as CTMs e o arcabouço, onde foi possível evidenciar o contato entre as interfaces do biomaterial com as células tronco mesenquimais.



FIGURA 30 – Projeções celulares (estrelas vermelhas) e a matriz depositada, possivelmente formada pelo Selante de Fibrina (setas amarelas). MET (Manila + Citrato de Chumbo) (3000X).



FIGURA 31 – Presença do núcleo celular (N), camadas formadas por projeções celulares (estrelas vermelhas) e matriz depositada (seta amarela). MET (Manila + Citrato de Chumbo) (6000X).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 CTMs – Isolamento e caracterização

Derivadas da medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*), as células tronco mesenquimais foram estudadas, isoladas, caracterizadas e utilizadas em conjunto com o biomaterial, Selante de Fibrina, com a finalidade de promover alternativas terapêuticas mais promissoras e eficientes, visando o poder de regeneração e diferenciação deste tipo celular.

Segundo BYDLOWSKI *et al.* (2009)<sup>1</sup>, as CTMs, como as utilizadas neste estudo, estão presentes no estroma da medula óssea, e possuem a capacidade de se diferenciarem em linhagens de células do tipo mesodérmico e possivelmente do tipo não mesodérmico, que seriam as células neurais e os hepatócitos. Também podem ser encontradas não só na medula óssea, mas em tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos<sup>21,96,23</sup>.

Optou-se pelo uso das CTMs provenientes da medula óssea dos ratos devido seu fácil isolamento e cultivo. Os animais utilizados como doadores possuíam no máximo 30 dias de vida, o que está de acordo com FIBBE (2002)<sup>97</sup>; ABDI *et al.* (2008)<sup>98</sup>, onde os autores relatam que com o avanço da idade, ocorre um declínio de CTMs na medula óssea.

Não existem apenas células tronco mesenquimais na medula óssea, visto isso, foi feito o isolamento e caracterização celular para se obter um cultivo purificado. FRIEDENSTEIN *et al.* (1970)<sup>9</sup>, foram os primeiros pesquisadores a identificar CTMs há mais de 40 anos e descreveram a capacidade que tais células possuíam de aderirem-se ao plástico.

O método de isolamento das CTMs deste estudo foi realizado através da separação da fração de células mononucleares por meio de gradiente de densidade conforme relatado por BYDLOWSKI *et al.* (2009)<sup>1</sup> como sendo a maneira mais frequentemente utilizada para obtenção das células mononucleares, e a partir disto, isola-se a fração desejada que no presente

estudo são as CTMs. Ainda de acordo com BYDLOWSKI *et al.* (2009)<sup>1</sup>, as CTMs formam colônias e possuem a capacidade de manter sua multipotência e seu potencial de crescimento por longos períodos, onde neste estudo, a confluência média atingida em um período de 12 dias de cultivo eram em torno de 80 a 90%, tanto para o cultivo associado com o Selante de Fibrina como para o cultivo sem o biomaterial. Sendo assim, as metodologias empregadas para a coleta, isolamento e cultivo das CTMs provenientes da medula óssea de ratos foram eficientes. Isto está de acordo com resultados obtidos por OSHIMA *et al.* (2005)<sup>99</sup>, que demonstraram em seus estudos que o tempo médio de isolamento de células provenientes de medula óssea dos fêmures e tíbias de ratos variou de 10 a 14 dias para atingirem a confluência média de 80% e apresentarem morfologia fibroblastóide de origem mesenquimal.

Cada célula presente no organismo apresenta marcadores de superfície que as caracterizam<sup>100</sup>. Porém, as CTMs possuem uma variedade muito grande de marcadores não específicos<sup>11</sup>, sendo que para caracterizá-las deve haver positividade para alguns marcadores e serem negativo para outros. Atento a isto, as populações celulares utilizadas neste estudo foram marcadas e analisadas pela citometria de fluxo apresentando altos níveis de marcação para os marcadores CD44 e CD90 (células tronco mesenquimais) e baixos níveis de marcação para o marcador CD34 (células tronco hematopoiéticas).

De acordo com os dados obtidos por FU *et al.* (2008)<sup>101</sup>, células tronco neurais derivadas de células tronco mesenquimais coletadas a partir da medula óssea expressaram antígenos característicos de células tronco mesenquimais para os marcadores CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 e proliferaram e diferenciaram em múltiplas linhagens mesodérmicas, incluindo adipócitos, condrócitos e osteoblastos, o que também está de acordo com os resultados obtido neste estudo, cujo as CTMs provenientes dos ratos foram capazes de se diferenciarem para linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas, evidenciando a sua multipotência.

Outras características importantes, que foram observadas e constatadas através da microscopia óptica de luz invertida, é o fenótipo fibroblastóide das células cultivadas sendo tipicamente fusiforme, que corrobora com o trabalho de UCCELLI *et al.* (2008)<sup>102</sup> no qual apresentam que o fenótipo da população

celular deve ser fibroblastóide e apresentar características morfológicas fusiformes e cuboidais.

Em relação ao potencial de diferenciação das células tronco, estas podem ser classificadas como: pluripotentes – gerando todos os tipos celulares, multipotentes – originam diversos tipos celulares dentro da mesma linhagem, oligopotentes – a partir de um mesmo tecido, originam células de diversas linhagens e unipotentes – originam um tipo celular<sup>103</sup>.

PITTENGER *et al.* (1999)<sup>6</sup> induziram uma colônia de células tronco mesenquimais para se diferenciar em linhagem adipogênica. A indução ocorreu aparentemente pelo acúmulo de gotas ricas em lipídeos no interior das células, corados com Oil Red-O Solution, cujo mais de 95% da colônia seguiu esta linhagem e as gotas de lipídeos continuaram a se desenvolver ao longo do tempo. Os adipócitos permaneceram saudáveis na cultura por pelo menos três meses.

No presente experimento, características semelhantes foram observadas nas culturas de CTMs induzidas com o kit de diferenciação para linhagem adipogênica - StemPro Adipogenesis Differentiation – Invitrogen. Analisando os cultivos, houve a mudança morfológica normalmente encontrada nas CTMs indiferenciadas de fusiformes para um aspecto ovóide com deposição de gotas de lipídeos no interior das células, típico de células da linhagem adipogênica. O processo de diferenciação pode ser confirmado com o procedimento de marcação pela solução Oil Red-O.

LIMA-NETO (2010)<sup>104</sup> utilizou como um dos métodos de caracterização, das CTMs provenientes de equinos, a capacidade que tais células tinham em se diferenciar para linhagem condrogênica. A partir de cultivos de segunda passagem foi possível induzir as CTMs a diferenciarem-se em condrócitos obtendo altos índices de marcação dos proteoglicanos produzidos a partir das células diferenciadas pelo corante Alcian Blue.

Foi possível observar dados semelhantes neste experimento, no qual culturas de CTMs foram induzidas com o kit de diferenciação para linhagem condrogênica – StemPro Chondrogenesis Differentiation – Invitrogen. Analisando os presentes cultivos, houve o aparecimento de lacunas

intercelulares como mudança morfológica mais evidente em relação ao cultivo controle de CTMs. A marcação realizada pelo corante Alcian Blue esteve presente, caracterizando a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos confirmando a diferenciação para a linhagem condrogênica.

LIMA *et al.* (2009)<sup>105</sup> avaliaram a capacidade de células tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de cães em diferenciar-se em linhagem osteogênica. Após 7 dias de cultivo em um dos grupos testados, as características morfológicas das CTMs resultaram de fusiformes para cubóides, o que se trata de um indicativo de diferenciação para a linhagem osteogênica. A marcação com solução de Alizarin Red demonstrou a ocorrência de acúmulo de cálcio confirmando a diferenciação.

Características semelhantes foram observadas neste estudo, no qual as culturas de CTMs provenientes de medula óssea de ratos foram induzidas com o kit de diferenciação para linhagem osteogênica – StemPro Osteogenesis Differentiation – Invitrogen. Não houve mudanças morfológicas aparentes como as encontradas em um dos grupos citados por LIMA *et al.* (2009)<sup>105</sup>. Porém, a análise da marcação com a solução de Alizarin Red foi evidente, demonstrando o acúmulo de cálcio no meio extracelular pelos osteócitos, desta maneira indicando que as células diferenciaram-se em osteoblastos funcionais. Isto indica que a diferenciação não deve ser levada em consideração apenas por características ou mudanças morfológicas nas células, mas sim pelo acúmulo de depósitos de cálcio, uma vez que implica a mudança do metabolismo celular.

De acordo com BYDLOWSKI *et al.* (2009)<sup>1</sup> as células tronco mesenquimais possuem a capacidade de formarem osteoblastos, condrócitos e adipócitos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Isso está de acordo com os resultados apresentados neste estudo, cujo CTMs provenientes da medula óssea de ratos diferenciaram-se em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica.

## 5.2 Biomaterial – Selante de Fibrina

O biomaterial, Selante de Fibrina, foi utilizado como arcabouço e mostrou ter ótima plasticidade e capacidade de interagir com as CTMs. Vale salientar que devido os experimentos serem realizados *in vitro* descarta-se a ação de reabsorção do biomaterial pelo organismo, promovendo períodos mais longos de contato entre o biomaterial e as CTMs.

Na análise pela microscopia óptica de luz invertida foi possível confirmar esta interação entre os dois componentes, onde as CTMs coletadas da medula óssea dos ratos cresceram e proliferaram em direção ao biomaterial e até mesmo em sua superfície, interagindo com o arcabouço biológico da maneira esperada.

Isso indicou que a associação do Selante de Fibrina, produzido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP, com as células tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de ratos foi possível. Isso corroborou com resultados obtidos por YAMADA *et al.* (2003)<sup>106</sup> que demonstraram que células tronco migraram e interagiram de maneira eficaz em associações com o Selante de Fibrina utilizado em seu estudo.

Entretanto, para que ocorra a captura das CTMs pelo Selante de Fibrina, vale salientar que o material deve ser preparado em conjunto com as células tronco previamente suspensas e diluídas em um dos componentes, para que no momento da formação e estabilização do biomaterial essas células sejam capturadas e fiquem aderidas a ele.

Nas avaliações realizadas pela microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, que teve como objetivo avaliar a interação das células com a superfície do biomaterial, foi possível observar grande quantidade de CTMs aderidas à intensa rede de fibrina formada pelo Selante, o que se assemelhou ao descrito por GARDIN *et al.* (2011)<sup>107</sup> promoveram a interação de células tronco provenientes de tecido adiposo em arcabouços baseados em Selante de Fibrina e ácido hialurônico e obteve crescimento celular em suas superfícies.

Em relação aos resultados obtidos pela microscopia eletrônica de transmissão, a presença de núcleos com características eucromáticas evidenciaram alta atividade metabólica e síntese ativa de proteínas. A matriz depositada ficou evidente, com essas características pode-se dizer que a interação de células tronco mesenquimais viáveis e ativamente funcionais com o Selante de Fibrina ocorreu. Isso condiz com resultados obtidos por TRUBIANI *et al.* (2008)<sup>108</sup> que mostraram um crescimento extensivo da biomassa de células tronco mesenquimais sobre os arcabouços utilizados em seus experimentos, sendo um deles a esponja de fibrina.

Além disso, foi realizado o teste de viabilidade celular através de marcadores de células vivas (Hoescht 33342) e células mortas (Iodeto de Propidium). As marcações das colônias de CTMs na presença do Selante de Fibrina demonstraram viabilidade acima de 75% das células em contato com o biomaterial, garantindo que a interação entre o arcabouço e as células fosse possível, mantendo a funcionalidade e viabilidade celular.

Nas análises dos experimentos onde foi testada a capacidade do Selante de Fibrina em induzir espontaneamente as CTMs em contato com o biomaterial a diferenciarem-se para linhagem adipogênica e condrogênica, não houve marcação relevante pelos corantes específicos para formação de depósitos ou gotas de lipídeos intracelulares (Oil Red-O Solution) ou produção de proteoglicanos pelos condrócitos (Alcian Blue) respectivamente. Demonstrando desta maneira, a incapacidade ou mesmo a neutralidade do Selante de Fibrina frente às CTMs coletadas da medula óssea de ratos em induzir algum tipo de diferenciação para essas linhagens citadas.

Em relação ao estudo realizado para a diferenciação espontânea para linhagem osteogênica na presença do biomaterial, houve marcação relevante pelo corante Alizarin Red. As células foram levadas a um início de diferenciação para osteoblastos. Uma das hipóteses é que após o tapete celular na superfície da placa de cultivo atingir confluência máxima, mantendo-se assim por um período prolongado de aproximadamente dez dias, induziu a ocorrência da diferenciação espontânea para a linhagem óssea. Outra possibilidade seria a presença de um dos componentes do biomaterial, o cloreto de cálcio, diluído no meio de manutenção das células que poderia ter

levado a indução das CTMs para esta linhagem. Descarta-se esta possibilidade do cloreto de cálcio presente no Selante de Fibrina ter sido marcado pelo corante Alizarin Red, pois além da quantidade ser ínfima, 2 $\mu$ L na concentração de 0,025 mMol/L em 5mL de meio de manutenção celular, o mesmo foi marcado separadamente com a solução específica para diferenciação osteogênica sem a presença das CTMs e não houve marcação.

Experimentos complementares foram realizados com a finalidade de descobrir os motivos de tais resultados obtidos referentes à diferenciação espontânea para a linhagem osteogênica.

Cultivos celulares de primeira passagem, sem a presença do Selante, cultivados com meio completo de alta glicose e com o meio completo de baixa glicose, após atingir a confluência máxima durante um período prolongado de tempo, 20 dias, foram capazes de induzir as colônias de CTMs a diferenciar-se para a linhagem osteogênica.

Isto está de acordo com a primeira hipótese citada acima, onde diz que as células foram levadas ao processo de diferenciação não pela presença do biomaterial, mas sim pelo longo período mantido em confluência máxima dos cultivos celulares. Talvez as células indiferenciadas tenham sido estimuladas a diferenciação para linhagem osteogênica devido ao sítio de coleta e a origem das CTMs serem a partir da medula óssea.

Também foram testados cultivos de CTMs na presença do biomaterial mantidos sem atingir a confluência máxima, onde não houve diferenciação para nenhuma linhagem celular, mantendo as células indiferenciadas para o caso de uma necessidade de se diferenciarem em novas populações celulares.

## 6. CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos nas condições experimentais apresentadas, pode-se concluir:

- A metodologia utilizada para coleta e cultivo das CTMs proveniente da medula óssea de ratos demonstrou-se eficiente.
- As CTMs e suas características morfológicas foram observadas e analisadas pela microscopia óptica de luz invertida e microscopia eletrônica no qual foi confirmada e caracterizada pela citometria de fluxo e diferenciação para linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.
- As CTMs foram capazes de se diferenciarem para linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica e a presença do Selante de Fibrina não interferiu na diferenciação.
- O Selante de Fibrina mostrou-se neutro em relação à indução de diferenciação espontânea para a linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica.
- O biomaterial utilizado, Selante de Fibrina, realizou a captura e permitiu o crescimento das CTMs que se aderiram em sua superfície, no qual foi confirmado através das técnicas microscópicas realizadas.
- A viabilidade das CTMs na superfície e em contato com o biomaterial foi comprovada pelas marcações com Hoescht 33342 e Iodeto de Propidium onde o biomaterial sustentou a sobrevivências das mesmas.

Estudos futuros deverão ser realizados com a finalidade de implantar arcabouços biológicos enriquecidos com células tronco em modelos experimentais *in vivo* a fim de investigar o tempo necessário de suporte mecânico para as células tronco mesenquimais se manterem no local alvo e atingirem a diferenciação esperada.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>xx</sup>

1. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(1):25-35.
2. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:102.
3. Pedersen RA. Embryonic stem cells for medicine. *Sci Am.* 1999;280:68-73.
4. Till JE, McCulloch EA. Hematopoietic stem cells, In *Hematopoietic Stem Cell Differentiation.* Elsevier. 1980:5-39.
5. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641-50.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
7. Caplan AI. Principles of regenerative medicine. 2th ed. Elsevier; 2011. p. 253-262.
8. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 2001;226(6):507-20.
9. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.
10. Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 2002;38:7-12.
11. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.
12. Krampera M, Marconi S, Pasini A, *et al.* Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone.* 2007;40:382-90.

---

<sup>xx</sup> As referências bibliográficas seguem as normas sugeridas pelo *International Committee of Medical Journal Editors* ("Vancouver"): *International Committee of Medical Journal Editors, Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals.* *Ann Intern Méd.* 1997; 126: 36-47.

13. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, *et al.* From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res.* 2006;312:727-36.
14. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kappor N, Meyers P, Chiareri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980;56:289–301.
15. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol.* 1985;13(4):237-43.
16. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol.* 1997;97:561-70.
17. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994;21:429-35.
18. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15(2):109-16.
19. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(12):895-902.
20. Verfaillie CM. Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002;12:502-08.
21. Meirelles LS, Caplan AL, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26:2287-99.
22. Friedenstein AI. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol.* 1982;44:3-11.
23. Zucconi E, Vieira NM, Bueno DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development.* 2009;1-33.
24. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, *et al.* Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics.* 2007;8:70.
25. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154-6.
26. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1981;78:7634-38.
27. Short B, Brouard N, Occhiodoro-scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34:565-71.

28. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Min Res.* 1993;8:1453-58.
29. Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion.* 1971;11:345-49.
30. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, *et al.* Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1996;11:312-24.
31. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;89:1235-49.
32. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, *et al.* Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* 2003;101:2999-3001.
33. Kang SK, Lee DH, Bae YC, *et al.* Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol.* 2003;183:355-66.
34. Mouiseddine M, Francois S, Semont A, *et al.* Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes severe combined immunodeficiency mouse model. *Br J Radiol.* 2007;80(1):S49-S55.
35. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2670-H76.
36. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(32):11474-9.
37. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116:769-78.
38. Park KS, Lee YS, Kang KS. *In vitro* neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J Vet Sci.* 2006;7(4):343-8.
39. Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells.* 2006;24(11):2346-54.
40. De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, *et al.* A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-

- derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2006;15(5):719-28.
41. Anisimov SV, Christophersen NS, Correia AS, Li JY, Brundin P. "NeuroStem Chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *BMC Genomics.* 2007;8:46.
  42. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following. *J Cell Biochem.* 1997;64:278-94.
  43. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259-64.
  44. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata KI, *et al.* Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg.* 2002;13(2):231-39.
  45. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* 2001;52:443-51.
  46. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1198-1211.
  47. Kojima K, Ignatz RA, Kushibiki T, *et al.* Tissue-engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor beta2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:147-53.
  48. Christman KL, Lee RJ. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(5):907-13.
  49. Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther.* 2005;105(2):151-63.
  50. Narmoneva DA, Vukmirovic R, Davis ME, Kamm RD, Lee RT. Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. *Circulation.* 2004;110(8):962-8.
  51. Bajpai PK. Immunological aspects of treated natural tissue prostheses. In: Williams DF. *Biocompatibility of tissue analogs.* Boca Raton CRC Press. 1985;1:5-25.
  52. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet.* 1999;354(Suppl. 1):S132-S34.
  53. Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells.* 2004;6(4):369-74.
  54. Hidaka C, Cunningham ME, Rodeo SA, Maher SA, Zhu W. Modern biologics used in orthopaedic surgery. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18:74-9.

55. Bruder SR, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cell in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355:247-56.
56. Bruder SP, Caplan AI. Bone regeneration through cellular engineering. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti JP. *Principles of tissue engineering*, 2nd ed. New York: Academic Press; 2000. p. 683-96.
57. Harada RN, Pressler VM, Mcnamara JJ. Fibrin glue reduces seroma formation in the rat after mastectomy. *Surg Gynecol Obstet.* 1992;175:450-4.
58. Lasa Jr. CI, Kidd RR, Nunez HA, Drohan WN. Effect of fibrin glue and opsite on open wounds in D/B D/B mice. *J Surg Res.* 1993;54:202-6.
59. Brennan M. Fibrin glue. *Blood Ver.* 1991;5:240-4.
60. Lerner R, Binur NS. Current status of surgical adhesives. *J Surg Res.* 1990;48:165-81.
61. Ducheneze B, Tahi H, Galand A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. *Cornea.* 2001;20:230-2.
62. Erdey RA, Lindahl KJ, Temnycky GO, Aquavella JV. Techniques for application of tissue adhesive for corneal perforations. *Ophthalmic Surg.* 1991;22:352-4.
63. Khadem J, Truong T, Ernest JT. Photodynamic biologic tissue glue. *Cornea.* 1994;13:406-10.
64. Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. *J Venom Anim Toxins.* 2001;7:1-10.
65. Fattahi T, Mohan M, Caldwell GT. Clinical applications of fibrin sealants. *J Oral Maxillofacial Surg.* 2004;62:218-24.
66. Bergel, S. Uber wirkungen des fibrins. *Dtsh Med Wochenschr.* 1909;35:633-65.
67. Barros LC, Ferreira Jr. RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, *et al.* A New Fibrin Sealant From *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 2009;12(8):553-71.
68. Wilson SM, Pell P, Donegan EA. HIV-1 transmission following the use of cryoprecipitate fibrinogen as gel/adhesive. *Transfusion.* 1991;31:S51.
69. Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. Avaliação do tempo de coagulação de trombina bovina, Reptilase®, e a fração trombina-like do veneno de *Crotalus durissus terrificus* utilizando bovinos, bubalinos, eqüinos, ovinos e crioprecipitado humano. *J Venom Anim Toxinas.* 1998;4:120-36.

70. Rahal SC, Amaral MSP, Pai VD, Barraviera SRCS, Caporali EHG, Crocci AJ. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2004;10(2):161-72.
71. Sierra DH. Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, materials properties and clinical applications. *J Biomater Appl*. 1993:309-52.
72. Spotnitz WD, Falstrom JK, Rodeheaver GT. The role of sutures and fibrin sealant in wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77:651-69.
73. Kram HB, Nathan RC, Stafford FJ, Fleming AW, Shoemaker WC. Fibrin glue achieves hemostasis in patients with coagulation disorders. *Arch Surg*. 1989;124:385-7.
74. Flemming I. Fibrin glue in faces lifts. *Facial Plastic Surg*. 1992;8:79-88.
75. Toma AG, Fisher EW, Cheesman AD. Autologous fibrin glue in the repair of dural defects in craniofacial resections. *J Laryngol Otol*. 1992;106:356-7.
76. Zusman SP, Lustig JP, Nun GB. Cost evaluation of two methods of post tooth extraction hemostasis in patients on anticoagulant therapy. *Community Dent Health*. 1993;10:167-73.
77. Mandel MA. Minimal suture blepharoplasty: closure of incisions with autologous fibrin glue. *Anesth Plast Surg*. 1992;16:269-72.
78. Hiraoka T, Kanemitsu K, Tsuji T, Saitoh N, Takamori H, Akamine T, *et al*. A method for safe pancreaticojejunostomy. *Am J Surg*. 1993;165:270-2.
79. Abel ME, Chiu YSY, Russell TR, Volpe, PA. Autologous fibrin glue in the treatment of rectovaginal complex fistulas. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:447-9.
80. Berger JT, Gilhooly J. Fibrin glue treatment of persistent pneumothorax in a premature infant. *J Pediatr*. 1993;122:958-60.
81. Leca F, Karam J, Vouhe PR, Khour YW, Tamisier D, Bical O, *et al*. Surgical treatment of multiple ventricular septal defects using a biologic glue. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;107:96-102.
82. Greco F, Depalma L, Spagnolo N, Rossi A, Specchia N, Gigante A. Fibrin-antibiotic mixtures: an *in vitro* study assessing the possibility of using a biological carrier for local drug delivery. *J Biomed Mat Res*. 1991;25:39-51.
83. Kram HB, Bansul M, Timberlake O, Sholmaker W. Antibacterial effects of fibrin glue and fibrin glue-antibiotics mixtures. *Trans Soc Biomat*. 1983;12:164.
84. Redl H, Schlag G, Stanek G, Hirschl A, Seelick T. In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. *Biomaterial*. 1983;4:29-32.

85. Thompson DF, Davis TW. The addition of antibiotics to fibrin glue. *South Med J.* 1997;90:681-4.
86. Sugitachi A, Shindo T, Kido T, Kawahara T. Bio-adhesiochemo-(BAC)-therapy. *Proc Am Cancer Res.* 1992;33:216.
87. Hashimoto J, Kusosaka M, Yoshiya S, Kazushi H. Meniscal repair using fibrin sealant and endothelial cell growth factor. *Am J Sports Med.* 1992;20:537-41.
88. Greisler HP, Cziperle DJ, Kim DA, Garfield JD, Petsikas D, Murchan PM, *et al.* Enhanced endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts by fibroblast growth factor type 1 pretreatment. *Surgery.* 1992;112:224-55.
89. Pinholt EM, Solheim E, Bang G, Sudmann E. Bone induction by composites of bioresorbable carriers and demineralized bone in rats. *Surgery.* 1992;50:1300-4.
90. Homminga GN, Buma P, Koot HW, Van der Kraan PM, Van den Berg WB. Chondrocyte behavior in fibrin glue *in vitro*. *Acta Orthop Scand.* 1993;64:441-5.
91. Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(8):1027-36.
92. Habibovic P, Yuan H, Valk CM, Meijer G, Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials.* 2005;26(17):3565-75.
93. Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, *et al.* Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(4):327-36.
94. Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:654–60.
95. Ryu JH, Kim IK, Cho SW, *et al.* Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials.* 2005;26:319-26.
96. Mambelli LI, Santos EJC, Frazão PJR, *et al.* Characterization of equine adipose tissue–derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering.* 2009;15(1):87-94.
97. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis.* 2002;61 Suppl 2:29-31.

98. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells. A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008;57:1759-67.
99. Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantations. *J of Histochemistry & Cytochemistry*. 2005;53(2):207-216.
100. Covas DT. Células-tronco mesenquimais. In: Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006. p.35-48.
101. Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih CC. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells and Development*. 2008;17:1109-22.
102. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature*. 2008;8:726-36.
103. Friel E, Sar S, Mee JP. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Advanced Drug Delivered Reviews*. 2005;57:1894-1903.
104. Lima-Neto JF. Isolamento, caracterização e diferenciação de células tronco embrionárias e mesenquimais de equinos [tese-doutorado]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista; 2010. 108p.
105. Lima SAF, Lima-Neto JF, Wodewotzky TI, Alvarenga FCL. Diferenciação in-vitro de células-tronco mesenquimais de cães em precursores osteogênicos. 17º Simp. Inter. Iniciação Científica da USP, SIICUSP. São Paulo. 2009.
106. 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. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2003;31:27-33.
107. Gardin C, Vindigni V, Bressan E, Ferroni L, Nalesso E, Puppa AD, D'Avella D, Lops D, Pinton P, Zavan B. Hyaluronan and fibrin biomaterial as scaffolds for neuronal differentiation of adult stem cells derived from adipose tissue and skin. *Int J Mol Sci*. 2011;12:6749-64.
108. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A, *et al*. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. *Biomed Mater Res A*. 2008;87:986-93.

## 8. ANEXO A - Parecer de aprovação pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



unesp



Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Criação prevista na Portaria CFM nº 20 de 26/04/85

# Certificado

*Certificamos que o Protocolo n.º 811 sobre o projeto de pesquisa "Avaliação da viabilidade de selante de fibrina derivada de veneno de serpente como Scaffold para células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos", de autoria de Vinicius Perón de Oliveira Gasparotto, orientado pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.*



Prof.ª Régina H. Garcia Martins  
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capeluzzi  
Secretário da CEEA

*Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 27/05/2010.*

Dielmo Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18 618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3611-0143 e-mail secretaria: capeluzzi@fmb.unesp.br

## 9. ANEXO B - Trabalho submetido ao The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases

- The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases  
Para [jvat@jvat.org.br](mailto:jvat@jvat.org.br), [juliana@jvat.org.br](mailto:juliana@jvat.org.br), [vini\\_peron@msn.com](mailto:vini_peron@msn.com)

### JVATiTD PAPER

### ARTIGO RECEBIDO

Obrigado por submeter seu artigo para publicação no **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**.

Para verificar o status do seu artigo, acesse <http://www.jvat.org.br> e clique em Submitted paper status.

Título	Viability of Fibrin Sealant from snake venom as scaffold to rat marrow-derived mesenchymal stem cells.		
Tipo	Original paper		
Nome completo	Vinicius Peron de Oliveira Gasparotto		
Email principal	<a href="mailto:vini_peron@msn.com">vini_peron@msn.com</a>		
Email alternativo			
Endereço	Av. José Ariano Rodrigues, 1426		
Cidade	Lins		
Estado	São Paulo		
CEP	16400-400		
País	Brasil		
Telefone			
Fax			
Usuário	<a href="mailto:vini_peron@msn.com">vini_peron@msn.com</a>		
Senha	[REDACTED]		
	<b>Co-autor</b>	<b>País</b>	<b>Instituição</b>
	Rui Seabra Ferreira Junior	Brasil	UNESP - Botucatu
			<b>E-mail</b>
			<a href="mailto:rui.ead@gmail.com">rui.ead@gmail.com</a>

<http://www.jvat.org.br/paper>