

**UNIVERSIDADE POSITIVO**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA CLÍNICA**

**BIOMATERIAIS XENOGÊNICOS ÓSSEOS NÃO INTERFEREM NA  
VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS –  
ESTUDO PILOTO**

**JEFERSON LUIS DE OLIVEIRA STROPARO**

Dissertação apresentada à Universidade Positivo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, pelo Programa de Mestrado Profissional em Odontologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. João César Zielak  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Moira Pedroso Leão

**CURITIBA**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca da Universidade Positivo - Curitiba – PR

Elaborado pelo Bibliotecário Douglas Lenon da Silva (CRB-9/1892)

S924 Stroparo, Jeferson Luis de Oliveira.

Biomateriais xenogênicos ósseos não interferem na viabilidade e proliferação de células-tronco mesenquimais : estudo piloto / Jeferson Luis de Oliveira. — Curitiba : Universidade Positivo, 2020.

55 f. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Positivo, Programa de Pós-graduação em Odontologia Clínica, 2020.

Orientadora: Prof. Dr. João César Zielak.

Co-orientador: Profa. Dra. Moira Pedroso Leão.

1. Odontologia clínica. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Materiais biocompatíveis. 4. Dente decíduo. 5. Polpa dentária. I. Zielak, João César. II. Leão, Moira Pedroso. III. Título.

CDU 616.314-77(043.3)



**UNIVERSIDADE  
POSITIVO**

**Programa de Mestrado Profissional em Odontologia Clínica**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de fevereiro de 2020, considerou o(a) candidato(a) **Jeferson Luis de Oliveira Stroparo** aprovado(a).

---

PROF. DR. JOÃO CÉSAR ZIELAK  
UNIVERSIDADE POSITIVO (UP)  
Presidente/Orientador (a)

---

PROF.ª DR.ª CÉLIA REGINA CAVICHIOLO FRANCO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR)  
Examinador I

---

PROF.ª DR.ª TATIANA MIRANDA DELIBERADOR  
UNIVERSIDADE POSITIVO (UP)  
Examinador II



Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no Centro de Processamento Celular da Curityba Biotech da Universidade Positivo. Teve como parceria para o desenvolvimento dos ensaios *in vitro* da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Célia Regina Cavichiolo Franco, do Departamento de Biologia Celular da UFPR-LIPS (laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados) e da discente mestranda Lisley Janowski Spisila do Departamento de Bioquímica da UFPR (laboratório de Oxidações Biológicas), orientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sheila Maria Brochado Winnischofer. No Setor de Ciências da Biológicas da Universidade Federal do Paraná-UFPR.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação a meus pais, por me darem as oportunidades de buscar meus sonhos e realizá-los.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, meu irmão e minha namorada, por tornarem tudo isso possível, por todo o apoio, amor e incentivo que tive ao longo desses anos de trabalho e dedicação.

Agradeço à Universidade Positivo pela bolsa meritória de 50% de desconto conquistada e toda a dedicação do corpo docente, orientadores, e todas as pessoas que apoiaram e também tornaram possível a realização desse trabalho.

Agradeço também especialmente aos professores João César Zielak, Tatiana Miranda Deliberador, Carmen Lucia Muller Storrer e Moira Pedroso Leão por todas as oportunidades, pelo aprendizado e pela confiança depositada ao longo de todo o curso

Agradeço também à Universidade Federal do Paraná e à Professora Célia Regina Cavichiolo Franco pela participação e contribuição nesse trabalho.

Meus agradecimentos a Curityba Biotech, pela infraestrutura com a sala ISO 7 para realização do estudo *in vitro*, pela parceria entre a Universidade Positivo com a Curityba Biotech minimizando os custos do trabalho

Agradecemos também a mestrandia Lisley Janowski Spisila do Departamento de Bioquímica da UFPR (laboratório de Oxidações Biológicas), do Setor de Ciências da Biológicas da Universidade Federal do Paraná- UFPR. pelos ensaios *in vitro*.

Agradecemos também ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo uso dos equipamentos e do microscópio eletrônico empregados no presente trabalho.

## **EPÍGRAFE**

“A persistência é o caminho para o êxito.”

Charles Chaplin.

## RESUMO

O uso de células, em especial as células-tronco mesenquimais (CTMs), é objeto de inúmeras pesquisas, incluindo a engenharia tecidual. Estas células são indiferenciadas, apresentando capacidade de diferenciação e auto-renovação. Tem o potencial de se transformar em múltiplos tipos celulares do organismo, podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, dependendo do estímulo que recebem. O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar em modelo *in vitro* a influência de biomateriais xenogênicos bovinos sobre células-tronco mesenquimais da polpa de dente decíduo, no intuito de identificar um biomaterial com maior potencial carreador de células, para posterior aplicação *in vivo* e/ou clínica. Os seguintes grupos foram usados: 1) Grupo C (controle), contendo apenas CTMs; 2) Grupo BP, contendo CTMs e Bonefill Porous® (0,60-1,50 mm); 3) Grupo BO, contendo CTMs e Bio-Oss® (0,25-1 mm). As CTMs (P3) utilizadas foram provenientes de um dente decíduo em exfoliação, de um doador do sexo masculino de 7 anos de idade. Uma alíquota de células foi submetida à imunofenotipagem por citometria de fluxo. Foram realizados os ensaios de viabilidade celular (vermelho neutro), citotoxicidade (MTT), e proliferação celular (crystal violeta); todos os grupos foram submetidos a uma análise morfológica por microscopia de luz (ML). Devido aos resultados dos testes anteriores, o biomaterial considerado com desempenho superior foi submetido à avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizados os tempos de 24, 48 e 72 h de cultivo. A validação das células-tronco mesenquimais demonstrou marcadores de superfície positivos para CD105, CD73, CD90, e negativos para CD45, CD34, CD14, CD19, e HLA-DR. Os resultados evidenciaram que ambos os biomateriais mantiveram viabilidade celular e citotoxicidade semelhantes ao grupo C. Quanto à proliferação, houve diferença para menor no grupo BO em relação aos outros grupos. À ML, o grupo BP apresentou células mais espraçadas e aderidas do que o grupo BO. Assim, ao MEV, as células do grupo BP apresentaram características de células mais ativas do que as do grupo C, com secreção de vesículas para a matrix extracelular. Logo, pode-se concluir que o BP apresentou maior potencial carreador de células-tronco para futuros trabalhos com aplicação *in vivo* e/ou clínica.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais, Biomaterial, Dente Decíduo, Polpa dentária.



Stroparo J.L.O. Bone xenogenic biomaterials do not interfere in the viability and proliferation of mesenchymal stem cells - study-pilot: Positivo University, 2020.

## ABSTRACT

The use of cells, especially mesenchymal stem cells (MSCs), is the subject of numerous researches, including tissue engineering. These cells are undifferentiated, presenting capacity for differentiation and self-renewal. They have the potential to transform into multiple cell types of the body, such as adipocytes, chondrocytes and osteoblasts, depending on the stimulus they receive. The main objective of this work was to evaluate, in an *in vitro* model, the influence of bovine xenogenic biomaterials on mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth, in order to identify a biomaterial with higher potential cell carrier, for subsequent *in vivo* and/or clinical application. The following groups were used: 1) Control C (control), containing only MSCs; 2) Group BP, containing MSCs and Bonefill Porous® (0.60-1.50 mm); 3) Group BO, containing MSCs and Bios-Oss® (0.25-1 mm). The MSCs (P3) used came from a deciduous tooth in exfoliation from a 7-year-old male donor. A cell aliquot was submitted to immunophenotyping by flow cytometry. Cell viability (neutral red), cytotoxicity (TMT), and cell proliferation (violet crystal) tests were performed; all groups were submitted to morphological analysis by light microscopy (ML). Due to the results of previous tests, the biomaterial considered with superior performance was submitted to ultrastructural evaluation by scanning electron microscopy (SEM). The times of 24, 48 and 72 h of cultivation were used. Mesenchymal stem cell validation demonstrated positive surface markers for CD105, CD73, CD90, and negative for CD45, CD34, CD14, CD19, and HLA-DR. The results showed that both biomaterials maintained cell viability and cytotoxicity similar to group C. As for proliferation, there was a difference for less in the BO group compared to the other groups. To ML, the BP group presented more spread and adhered cells than the BO group. Thus, at SEM, the cells of the BP group presented characteristics of cells more active than those of group C, with secretion of vesicles to the extracellular matrix. Therefore, it can be concluded that BP presented a higher potential stem cell carrier for future studies with *in vivo* and/or clinical application.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, Biomaterial, Deciduous tooth, Dental pulp.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
2. PROPOSIÇÃO	5
3. MANUSCRITO	7
3.1 INTRODUÇÃO	9
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.2.1 <i>Procedimentos Laboratoriais</i>	11
3.2.1.1 <i>Isolamento e Cultivo Celular</i>	11
3.2.1.2 <i>Citometria de Fluxo</i>	12
3.2.2 <i>Desenho do Estudo</i>	13
3.2.3 <i>Citotoxicidade Celular (MTT)</i>	123
3.2.4 <i>Proliferação celular (Cristal Violeta) e Viabilidade Celular (Vermelho Neutro)</i>	14
3.2.5 <i>Análise Estatística</i>	15
3.2.6 <i>Microscopia de Luz (ML) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	15
3.3 RESULTADOS	16
3.3.1 <i>Citometria de Fluxo</i>	16
3.3.2 <i>Ensaio de Citotoxicidade, viabilidade e proliferação celulares</i>	16
3.3.2.1 <i>Análise de Citotoxicidade (MTT)</i>	17
3.3.2.2 <i>Análise de Viabilidade Celular (Vermelho Neutro)</i>	17
3.3.2.3 <i>Análise de Proliferação celular (Cristal Violeta)</i>	17
3.3.3 <i>Análise morfológica em microscopia de luz (ML) das células controle e expostas aos biomateriais BP e BO</i>	19
3.3.4 <i>Análise morfológica e ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células C e BP</i>	22
3.4 DISCUSSÃO	23
3.5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	28
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35



## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos, uma nova possibilidade de tratamento tem sido testada: terapia com células-tronco. Essas células possuem características fundamentais para a regeneração óssea, uma vez que são angiogênicas, adipogênicas, miogênicas, condrogênicas e osteogênicas (Shen *et al.*, 2011). Existem quatro tipos básicos de células-tronco: as totipotentes, que são oriundas dos zigotos (fase embrionária inicial antes da diferenciação dos tecidos básicos: ectoderme, mesoderme e endoderme); as pluripotentes que são células-tronco embrionárias que dão origem à ectoderme, mesoderme e endoderme; as multipotentes (ou células-tronco adultas), que possuem a diferenciação mais limitada, dando origem às células especializadas dos diferentes tecidos do corpo humano (um exemplo são as células-tronco mesenquimais, presentes em tecidos já formados); e as unipotentes, que tem capacidade de se diferenciar apenas em um tipo de tecido (Amini *et al.*,2012; Carvalho *et al.*,2012).

As células-tronco mesenquimais têm um elevado potencial proliferativo, podendo se diferenciar em células nervosas, adipócitos, condrócitos, odontoblastos e osteoblastos, dependendo do estímulo que recebem (Amini *et al.*,2012).

A cavidade bucal é fonte promissora de células-tronco mesenquimais, com potencial osteogênico, esses tecidos de onde elas podem ser extraídos geralmente são descartados, por isso é interessante o seu armazenamento (Estrela *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Buduru *et al.*, 2019).

A fonte ideal de células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual deve possuir características como alta pureza, alta proliferação, multipotencialidade, e facilidade de coleta. Dentre as fontes dessas células estão: a medula óssea (*Bone marrow stem cells*, BMSCs), o tecido adiposo (*Adipose stem cells*, ASCs), as células do ligamento periodontal (*Periodontal ligament stem cells*, PDLSCs), a polpa de dentes (*Dental pulp stem cells*, DPSCs) e também

polpa de dentes decíduos (*Stem cells from human exfoliated deciduous tooth*, SHED)(Egusa *et al.*, 2012;Kishimoto *et al.*, 2018).

Dentre as fontes de células-tronco, o tecido adiposo tem se demonstrado promissor, uma vez que apresenta um rendimento considerável, e dependendo da região anatômica, menor incômodo pós-operatório do que os aspirados medulares (Caplan, 2007; Shayesteh *et al.*, 2008; Rezai *et al.*, 2017). O tecido adiposo tem demonstrado ASCs com cerca de 500 vezes maior potencial de proliferação do que as células obtidas pela aspiração da medula óssea. Assim, destaca-se a importância do desenvolvimento desse tipo de fonte de obtenção celular (Fraser *et al.*, 2006; Rezai *et al.*, 2017).

As ASCs obtidas da bola de Bichat, por exemplo, demonstram um potencial de proliferação maior do que outras fontes de tecido adiposo (Fraser *et al.*, 2006; Peñarrocha-Diago *et al.*, 2015; Rezai *et al.*, 2017). Também demonstram maior potencial osteogênico (Rezai *et al.*, 2017). Essas células se diferenciam em vários tipos de células de linhagem mesenquimal, incluindo adipogênica, miogênica, condrogênica, e osteogênicas; em condições angiogênicas também podem promover uma nova vascularização (Shen *et al.*, 2011). O tecido da bola de Bichat tem acesso relativamente simples, podendo ser obtido via cavidade oral, sem prejuízo estético de cicatriz, por exemplo. Considerado, portanto, como fonte adequada de ASCs que possibilitam uma aplicação clínica (Niada *et al.*, 2013; Salehi-Nik *et al.*, 2017).

Segundo Seo *et al.* (2004), por sua vez, as PDLSCs tem grande potencial regenerativo e de reparação de estruturas dentais danificadas, por isso tem atraído atenção no mundo acadêmico. Elas têm poder de se diferenciar em células de linhagens, condrogênicas, cardiomiogênicas, neurogênicas e osteogênicas, sendo características necessárias para formação do ligamento periodontal e de tecidos de suporte, dentre eles o osso alveolar,

cimento, nervos e vasos sanguíneos (Shiet *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011; Byung *et al.*, 2019).

As PDLSCs tem origem dentária, sendo células multipotentes pós-natais semelhantes às BMSCs. Sendo assim, essas células podem se diferenciar em fibroblastos do ligamento periodontal, cementoblastos, osteoblastos e reparar defeitos ósseos (Trubiani *et al.*, 2015; Byung *et al.*, 2019). Porém, as PDLSCs tem uma certa desvantagem, elas só podem ser obtidas em pequenas quantidades. Segundo Iwata *et al.* (2010) o número é cerca de 1250 em média, sendo que de acordo com Feng *et al.* (2010) para regeneração são necessárias  $4 \times 10^6$  células, ou seja, a cultura primária deve ser proliferada pelo menos até 12 passagens de proliferação, antes de qualquer uso clínico (Iwata *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2010). Segundo Byung *et al.* (2019), a partir da passagem 7 das PDLSCs, observaram uma perda severa da morfologia inicial, e quanto maior a passagem, maiores eram as mudanças morfológicas também.

Por sua vez, a polpa dentária é composta por um tecido conjuntivo altamente vascularizado e envolto por uma estrutura mineral de dentina, que protege a polpa de estímulos externos nocivos. Principalmente a polpa de dentes decíduos é rica em células-tronco (Nanci, 2007; Rosa, 2013; 2016).

À medida que ocorre a rizólise, a dentição decídua cede lugar à dentição permanente, e o dente decíduo e todo o tecido que o acompanha geralmente são descartados, mesmo sendo rico em células-tronco do tipo mesenquimais (Rosa *et al.*, 2016). Essas células-troncos tem um elevado potencial proliferativo, podendo se diferenciar em odontoblastos, adipócitos, células neurais, as células-tronco também demonstrando potencial osteogênico maior (Rezai *et al.*, 2017) e propriedades angiogênicas, podendo estimular uma nova vascularização, característica desejável aos procedimentos de enxertos (Miura *et al.*, 2003).

As conhecidas SHEDs são as primeiras células-tronco de origem dental com potencial osteogênico, e características mesenquimais comparadas às células de medula óssea, apresentando maior proliferação e maior capacidade de formação de unidades formadoras de colônia, tendo uma maior eficiência na proliferação, além de possuírem uma expressão gênica com potencial de mineralização (Shi *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2019).

As SHEDs tem uma capacidade de autorrenovação muito maior que as DPSCs, sendo mais suscetíveis à diferenciação osteogênica (Aghajani *et al.*, 2016; Ichianagi *et al.*, 2010; Buduru *et al.*, 2019).

Com o aumento da disponibilidade de produtos comerciais xenogênicos, torna-se importante a avaliação destes biomateriais frente às células-tronco, uma vez que podem ser destinados às reconstruções ósseas de forma mais eficiente se já estiverem associados às células, antes da aplicação clínica. Estudos *in vitro* podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para os estudos *in vivo* e clínicos.

## 2. PROPOSIÇÃO

Avaliar em modelo *in vitro* a influência de biomateriais xenogênicos bovinos sobre células-tronco mesenquimais da polpa de dente decíduo, no intuito de identificar um biomaterial com maior potencial carreador de células, para posterior aplicação *in vivo* e/ou clínica.



### 3. MANUSCRITO

#### **Biomateriais xenogênicos ósseos não interferem na viabilidade e proliferação de células-tronco mesenquimais – estudo-piloto**

#### **RESUMO**

O uso de células, em especial as células-tronco mesenquimais (CTMs), é objeto de inúmeras pesquisas, incluindo a engenharia tecidual. Estas células são indiferenciadas, apresentando capacidade de diferenciação e auto-renovação. Tem o potencial de se transformar em múltiplos tipos celulares do organismo, podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, dependendo do estímulo que recebem. O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar em modelo *in vitro* a influência de biomateriais xenogênicos bovinos sobre células-tronco mesenquimais da polpa de dente decíduo, no intuito de identificar um biomaterial com maior potencial carreador de células, para posterior aplicação *in vivo* e/ou clínica. Os seguintes grupos foram usados: 1) Grupo C (controle), contendo apenas CTMs; 2) Grupo BP, contendo CTMs e Bonefill Porous® (0,60-1,50 mm); 3) Grupo BO, contendo CTMs e Bio-Oss® (0,25-1 mm). As CTMs (P3) utilizadas foram provenientes de um dente decíduo em exfoliação, de um doador do sexo masculino de 7 anos de idade. Uma alíquota de células foi submetida à imunofenotipagem por citometria de fluxo. Foram realizados os ensaios de viabilidade celular (vermelho neutro), citotoxicidade (MTT), e proliferação celular (cristal violeta); todos os grupos foram submetidos a uma análise morfológica por microscopia de luz (ML). Devido aos resultados dos testes anteriores, o biomaterial considerado com desempenho superior foi submetido à avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizados os tempos de 24, 48 e 72 h de cultivo. A validação das células-tronco mesenquimais demonstrou marcadores de superfície positivos para CD105, CD73, CD90, e negativos para CD45, CD34, CD14, CD19, e HLA-DR. Os resultados evidenciaram que ambos os biomateriais mantiveram viabilidade celular e citotoxicidade semelhantes ao grupo C. Quanto à proliferação, houve diferença para

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

menor no grupo BO em relação aos outros grupos. À ML, o grupo BP apresentou células mais espalhadas e aderidas do que o grupo BO. Assim, ao MEV, as células do grupo BP apresentaram características de células mais ativas do que as do grupo C, com secreção de vesículas para a matrix extracelular. Logo, pode-se concluir que o BP apresentou maior potencial carreador de células-tronco para futuros trabalhos com aplicação *in vivo* e/ou clínica.

**Palavras-chave:** Células-tronco, SHED, Biomaterial Xenogênico, Polpa de Dentes Decíduos.

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

### 3.1 INTRODUÇÃO

Perdas traumáticas de dentes ou de tecido ósseo decorrentes de acidentes, doença periodontal, cárie dentária ou outras intercorrências, precisam ser tratadas. Isso faz com que o profissional da área da saúde busque terapias reconstrutivas tais como enxertos para recuperação das áreas lesadas (Manfro *et al.*, 2014; Sakkas *et al.*, 2017).

Um enxerto ósseo precisa de características osteogênicas para gerar um novo osso, podendo representar uma matriz que pode servir de arcabouço, conter sinais químicos que podem ser osteoindutivos, nutrientes e suprimentos sanguíneos para que ocorra o desenvolvimento celular (Zimmermann *et al.*, 2011; Amini *et al.*, 2012).

Entre os fatores mais importantes para o sucesso do enxerto está a vascularização. Espera-se que as manobras cirúrgicas preservem o suprimento sanguíneo, respeitando a anatomia local, uma vez que com a vascularização adequada a osteointegração pode ocorrer de forma mais rápida e eficiente, para que ao final obtenha-se uma base óssea de maior qualidade em tempo reduzido. Espera-se uma maior migração de osteoblastos para a região e indução óssea por estímulo às células-tronco, aumentando a deposição mineral no local (Hämmerle e Lang, 2001; Amini *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, uma nova possibilidade de tratamento tem sido testada: terapia com células-tronco. Essas células possuem características fundamentais para a regeneração óssea, uma vez que são angiogênicas e osteogênicas (Shen *et al.*, 2011).

As células-tronco mesenquimais têm um elevado potencial proliferativo, podendo se diferenciar de acordo com o estímulo que recebem (Amini *et al.*, 2012). As células-tronco encontradas nos dentes decíduos (SHEDs), por exemplo, como normalmente são descartadas, podem servir para o armazenamento e pesquisas. Como os dentes decíduos são normalmente  
Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A.  
Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

encontrados em indivíduos muito jovens, as características dessas células são promissoras, uma vez que possuem um potencial proliferativo importante (Rosa *et al.*, 2016).

Zimmermann *et al.*, (2015) demonstram a associação de células-tronco (ASCs) com biomaterial xenogênico para enxerto. Esse tipo de biomaterial apresenta componentes estruturais semelhantes aos do osso humano (Manfro *et al.*, 2014), tendo uma taxa de formação óssea previsível, permitindo a deposição de osso maduro sobre o mesmo (Hämmerle e Lang, 2001; Jensen *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014).

Em outro estudo, Trubiani *et al.* (2007) realizaram ensaios com PDLSCs, realizando osteoindução das células-tronco semeadas em um biomaterial xenogênico bovino. O trabalho demonstra que as células tinham uma alta afinidade pelos biomateriais tridimensionais: proliferação e colonização celular foram evidentes (Trubiani *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* podem fornecer informações importantes a fim de nortear os estudos *in vivo* e as aplicações clínicas (Wolf *et al.*, 2015). Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar em modelo *in vitro* a influência de biomateriais xenogênicos bovinos sobre células-tronco mesenquimais da polpa de dente decíduo, no intuito de identificar um biomaterial com maior potencial carreador de células, para posterior aplicação *in vivo* e/ou clínica.

### **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE: 13434019.7.0000.0093). As células-tronco utilizadas neste trabalho foram provenientes de um descarte de um dente decíduo esfoliado e doado para pesquisa, a partir de um paciente atendido na Clínica da

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

Infância da Universidade Positivo, Curitiba/PR. O isolamento e cultivo das células-troncos foi feito no Centro de Processamento Celular da Curitiba Biotech, pelo protocolo de Hendijani *et al.*, (2017).

### **3.2.1 Procedimentos Laboratoriais**

#### *3.2.1.1 Isolamento e Cultivo Celular*

Após a obtenção do dente exfoliado (remanescentes da coroa e polpa) este foi colocado em um tubo Falcon (BD Biosciences- Franklin Lakes, NJ USA ) contendo 15 mL de meio para transporte (1% de antifúngico a 250 µg/mL [anfotericina B], 1% antibiótico [penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 mg/mL - Gibco, Waltham, EUA]) e o meio de cultivo (DMEM, baixa glicose com L-glutamina e piruvato sólido - Gibco, Waltham, EUA). O tubo então foi levado imediatamente ao laboratório para o processamento da amostra. Dentro de cabine de segurança biológica tipo II (Telstar Bio II Advance, FACScalibur, BD, Franklin Lakes, EUA), instalada em sala limpa ISO 7, o tecido foi fracionado para realizar o isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs) pela técnica do explante. Procede-se fragmentar o tecido em diversos pedaços de 1 mm<sup>2</sup> aproximadamente, e dispor estes fragmentos no fundo de uma garrafa de 25 cm<sup>3</sup> (BD Biosciences), mantendo uma distância aproximada de 3 mm entre eles. Subsequentemente, o material foi levado à incubadora a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar saturado umidificado (Panasonic, Japão), até que os explantes tivessem aderência ao fundo da garrafa. Após esta etapa, adicionaram-se 5 mL de meio de cultivo padrão suplementado à garrafa, com cuidado para que os fragmentos não se

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

desprendessem do fundo. De volta à incubadora por 48 horas a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar saturado umidificado, o meio foi aspirado e trocado. As células foram observadas em microscópio invertido (AE 31 Trinuclear, MOTIC, China), até atingirem uma confluência de 70%, (3ª passagem), atingindo 1,5 x 10<sup>6</sup> células.

### 3.2.1.2 Citometria de Fluxo

Para a confirmação de que as células cultivadas pertenciam à linhagem de células-tronco mesenquimais, as células passaram pela citometria de fluxo e marcadores de superfície (Laboratório do Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil). Os critérios estabelecidos consideraram resultados positivos acima de 70%, e negativos os resultados abaixo de 10%. Quanto à viabilidade, empregou-se o kit de detecção de células em apoptose e necrose (APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD, BioLegend, San Diego, EUA). Quanto à imunofenotipagem, foram considerados os fatores positividade para os marcadores CD105, CD73 e CD90, e negatividade para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR, conforme protocolo de Dominici (2006). Células da terceira passagem foram avaliadas no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, Franklin Lakes, EUA) para avaliação da viabilidade e identificação dos principais marcadores de CTMs. Foram usadas 100.000 células por tubo de citometria e cada amostra foi passada uma vez pelo citômetro. Também empregou-se os anticorpos primários específicos: mouse anti-human CD105 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), mouse anti-human CD73, CD90, CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR (ABD Serotec, Raleigh, EUA). O anticorpo isótopo correspondente foi utilizado como controle negativo, e como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo goat anti-mouse IgG (H/L – FITC, ABD, Raleigh,

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

Serotec). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo (TreeStar, Ashland, EUA).

### 3.2.2 *Desenho do Estudo*

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, em triplicatas. Após as células atingirem confluência (70%), estas foram lavadas com PBS a 37 °C, desaderidas quimicamente sob ação tripsina-EDTA e contadas em Câmara de Neubauer. Plaqueou-se  $2 \times 10^4$  células por poço, de acordo com os grupos:

- 1) Grupo C (Controle): contendo somente CTMs;
- 2) Grupo BP (Bonefill Porous®, granulação média de 0,60-1,50mm, Bionnovation Biomedical, Bauru, Brasil): os poços continham CTMs e 3 mg de biomaterial dentro de inserto com 3 µm de porosidade (EasyStrainer, GreinerBio-One, Kremsmünster, Áustria);
- 3) Grupo BO (Bios-Oss®, granulação média 0,25-1,0mm, Geistlich Pharma, Suíça): os poços continham CTMs e 3 mg de biomaterial dentro de inserto com 3 µm de porosidade;

Todos os grupos foram mantidos por 24, 48 e 72 h, e seguiram para os ensaios.

### 3.2.3 *Citotoxicidade Celular (MTT)*

Cerca de  $2 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas em placa de 24 poços, em triplicata, com volume de meio de 200 µL/poço. Após 24 h, o sobrenadante foi substituído e as células incubadas com os biomateriais pelos tempos de 24, 48 e 72 h. Depois de transcorrido os tempos de tratamento, o meio foi retirado e adicionaram-se 200 µL da solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiliazol-2-il)carboximetil-2,5-difenilmetano. Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) diluído em PBS (0,5 mg/mL). As placas foram protegidas da luz, e após 3 h de incubação em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> o sobrenadante foi retirado, e as células foram ressuspensas em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 545 nm no leitor de microplacas (Epoch, Biosystem Biotek, Winooski, Eua). Os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Califórnia.).

### 3.2.4 Proliferação celular (Cristal Violeta) e Viabilidade Celular (Vermelho Neutro)

Para a análise da proliferação celular empregou-se o método de cristal violeta. As placas tiveram toda a solução retirada, foram lavadas com PBS e fixadas em 50 µL de metanol por 3 min. Em seguida, o metanol foi removido e foram acrescentados 100 µL de cristal violeta 0,2%, em etanol 5% por 10 min. Os poços foram lavados em PBS por seis vezes para remoção de corante residual. Então, foram adicionados 200 µL de citrato de sódio 0,1 M em etanol 50%. No leitor de microplacas, a leitura da absorbância foi realizada em 550 nm (Epoch, Biosystem Biotek, Winooski, Eua).

Para a avaliação da viabilidade, cerca de  $2 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas em placa de 24 poços, com volume de meio de 200 µL/poço. Após 24 h, o sobrenadante foi substituído e as células incubadas com os biomateriais pelos tempos de 24, 48 e 72 h. Depois de transcorrido os tempos de tratamento, o meio foi retirado e foram adicionados 200 µL da solução de vermelho neutro diluída em PBS (550µg/mL), e incubada por 2 h em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Todo o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados com PBS e foram adicionados 100 µL da solução de extração (etanol absoluto, água ultrapura e ácido acético  
Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A.  
Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).



glacial) e a placa foi agitada em *shaker* por 20 min para homogeneização. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 550 nm (Epoch, Biosystem Biotek, Winooski, Eua). Os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Califórnia.).

### 3.2.5 *Análise Estatística*

Os dados para os diferentes ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular foram analisados estatisticamente por ANOVA dois fatores e teste de Tukey com nível de significância de 5%.

### 3.2.6 *Microscopia de Luz (ML) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Antes das amostras serem inseridas no leitor de microplacas (Ensaio de Proliferação), foi utilizado o microscópio invertido (AE 31 Trinuclear, MOTIC, China) para captação de imagens e avaliação morfológica básica das células (20 ×). As imagens foram transformadas para escala de cinza.

De acordo com os resultados de médias totais no teste de proliferação, as células com médias totais maiores entre os grupos BP e BO, seguiram para análise em MEV, juntamente com as do grupo C. Para avaliação da ultraestrutura,  $2 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro no fundo. Após, as células foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%,  $\text{CaCl}_2$  1 mM em tampão cacodilato 0,1 M) por 1 h. Após fixação, as células foram lavadas

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, e desidratadas em etanol (30, 50, 70, 90 e 2 vezes 100%), por 10 min. em cada concentração. Após desidratação, as lamínulas foram submetidas ao ponto crítico (Critical Point Dryer 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e metalização em ouro (SCD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA 3 LMU, Brno, República Tcheca). Após, as imagens obtidas foram avaliadas no programa ImageJ (NIH, EUA) quanto à % de células por área. Estas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Brasil.

### **3.3 RESULTADOS**

#### *3.3.1 Citometria de Fluxo*

Os resultados da utilização do kit de detecção de células em apoptose e necrose foram: células em apoptose (0,43%), células em necrose (5,27%) e viabilidade celular (94,3%). Quanto à caracterização, os marcadores de superfície confirmaram o fenótipo de células-tronco mesenquimais, positivos para: CD105 (88,9 %); CD73 (93,5 %); CD90 (97,9 %); e negativos para: CD45 (1,03 %), CD34 (0,78 %); CD14 (2,17 %); CD19 (2,34 %); HLA-DR (0,74 %).

#### *3.3.2 Ensaios de Citotoxicidade, viabilidade e proliferação celulares*

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

Os dados para os diferentes ensaios de viabilidade celular foram analisados estatisticamente por ANOVA dois fatores e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As médias e desvios-padrão para os grupos avaliados estão nas Tabelas 1, 2 e 3.

### 3.3.2.1 Análise de Citotoxicidade (MTT)

Para o ensaio de citotoxicidade, os resultados indicaram diferenças estatísticas significantes para o fator biomaterial ( $p=0,004$ ) e tempo ( $p<0,001$ ). A interação dupla foi estatisticamente significativa ( $p=0,038$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Médias e desvios-padrão para os valores de citotoxicidade celular pelo método do MTT dos diferentes biomateriais e tempos.

Biomaterial	Tempo		
	24h	48h	72h
<b>C</b>	0,2482± 0,0328 Ba	0,2398± 0,0142 Bab	0,3545± 0,0317 Aa
<b>BP</b>	0,2337± 0,0221 Ba	0,2457± 0,465 Ba	0,2993± 0,0249 Ab
<b>BO</b>	0,2182± 0,0143 Ba	0,2023± 0,0202 Bb	0,3238± 0,0283 Aab

Na linha, valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas são estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ). Na coluna, valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas são estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.2.2 Análise de Viabilidade Celular (Vermelho Neutro)

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

Neste ensaio, os resultados (médias) indicaram diferenças estatísticas significantes para o fator biomaterial ( $p = 0,010$ ) e tempo ( $p < 0,001$ ). A interação dupla também foi estatisticamente significativa ( $p = 0,029$ ). Na Tabela 2, os resultados podem ser observados globalmente.

**Tabela 2** – Médias  $\pm$  desvios-padrão para os valores de viabilidade celular pelo método do vermelho neutro dos diferentes biomateriais e tempos.

<b>Biomaterial</b>	<b>Tempo</b>		
	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>C</b>	1,4922 $\pm$ 0,2504 Aba	1,3623 $\pm$ 0,0517 Ba	1,6602 $\pm$ 0,0702 Aa
<b>BP</b>	1,2243 $\pm$ 0,1255 Bb	1,2433 $\pm$ 0,0487 Bab	1,6307 $\pm$ 0,1237 Aa
<b>BO</b>	1,4582 $\pm$ 0,1631 Aa	1,1158 $\pm$ 0,1254 Bb	1,5368 $\pm$ 0,2305 Aa

Na linha, valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas são estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ). Na coluna, valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas são estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.2.3 Análise de Proliferação celular (Cristal Violeta)

Para este ensaio, os resultados indicaram diferenças estatísticas significantes para o fator biomaterial ( $p = 0,007$ ) e tempo ( $p < 0,001$ ). A interação dupla não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,091$ ). Os valores podem ser observadas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Médias e desvios-padrão para os valores de proliferação pelo método do cristal

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

violeta dos diferentes biomateriais e tempos.

Biomaterial	Tempo			
	24h	48h	72h	Total
C	0,2273± 0,0306	0,2447± 0,0344	0,6005± 0,0572	<b>0,3575± 0,1814 a</b>
BP	0,1962± 0,0109	0,2655± 0,0448	0,5043± 0,0684	<b>0,3220± 0,1430 a</b>
BO	0,2032± 0,0439	0,1608± 0,0536	0,4950± 0,1422	<b>0,2863± 0,1753 b</b>
<b>Total</b>	<b>0,2089± 0,0326 B</b>	<b>0,2237± 0,0628 B</b>	<b>0,5333± 0,1034 A</b>	

Na linha, valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas são estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ). Na coluna, valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas são estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.3 Análise morfológica em microscopia de luz (ML) das células controle e expostas aos biomateriais BP e BO

As análises em ML demonstraram que a linhagem de células do grupo C mantidas no cultivo celular somente na presença de meio (Figuras 1A a 1C), após 1A (24h), 1B (48h) e 1C (72h), apresentaram-se aderidas e espaiadas ao substrato, com diferentes padrões morfológicos; são células que se mantiveram dispostas lado a lado e apresentaram inibição por contato. Tem-se células em subconfluência bem evidente nas Figuras 1A e 1B. Na Figura 1C, após 72 h, de forma evidente apresentaram uma maior dinâmica de proliferação celular, com um maior número de células, mas com cultivo ainda em subconfluência. Também emitiram características projeções do corpo celular, evidenciando células com distintas morfologias. Vê-se por sobre o cultivo, Figuras 1A e 1B, células de menor tamanho e arredondadas, características de células mortas ou em processo de sofrimento celular. Estas Figuras apresentaram padrão morfológico característico para esta linhagem celular.

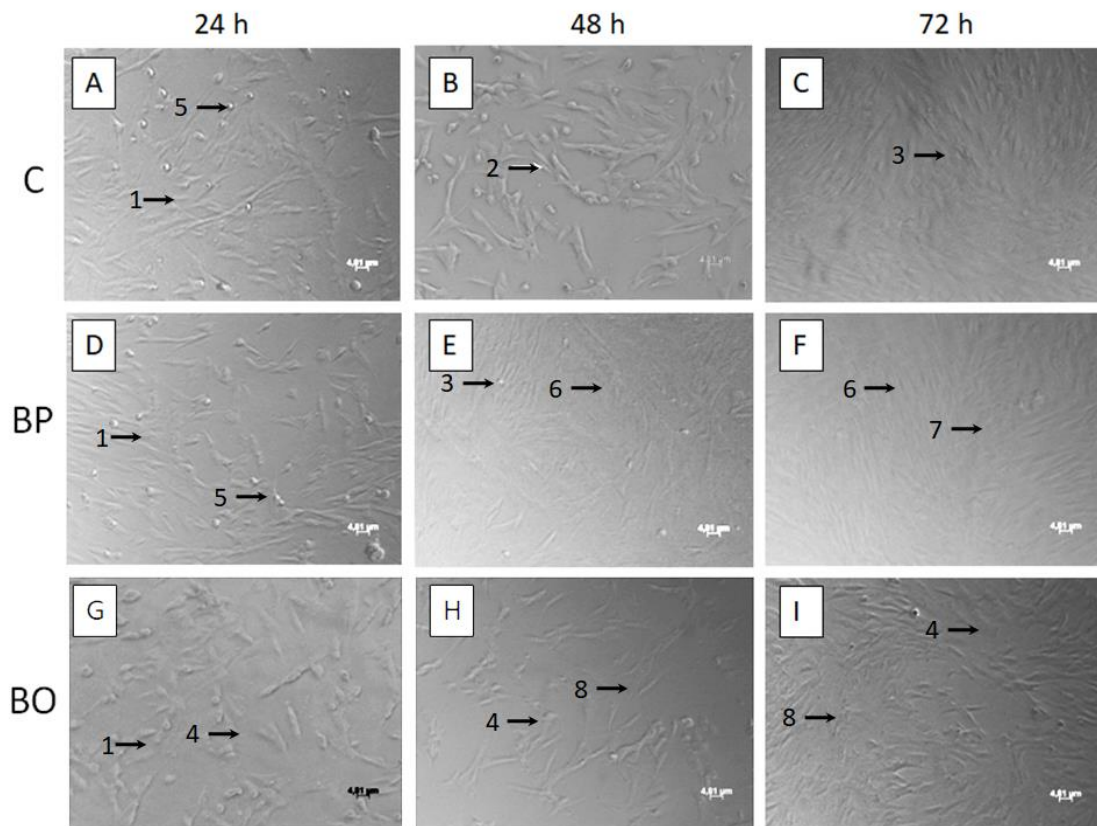
Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

As Figuras 1D e 1F são de cultivo de células expostas ao biomaterial BP. Estas evidenciaram respostas semelhante aos observados para as células do grupo C, no que se refere ao padrão morfológico das células. São células que se mantiveram aderidas e espalhadas ao substrato, com diferentes padrões morfológicos. Após o tratamento, são células que não se empilharam, e mantiveram-se dispostas lado a lado com inibição por contato. De forma interessante, pode-se observar que após tratamento com este biomaterial, estas células têm forma nítida, comparando as Figuras do grupo C (1A, 1B e 1C), especialmente nos tempos de 48 h e 72 h. Nas Figuras 1E e 1F observa-se que as células após tratamento são células mais alongadas, nitidamente com morfologia mais filiforme. De forma evidente vê-se que a exposição ao biomaterial, já em 48 h (1E), há um maior número de células quando comparado com as do grupo C no mesmo tempo de exposição (1B). Este resultado foi potencializado para o tempo de 72 h, comparando Figura das células do C (1C), com as Figuras (1F) após exposição ao BP. Já no tempo de 48h (1E), quase atingiram a confluência celular, e com 72 horas (1F), fica evidente a confluência. Resultado este que sugere que o biomaterial induziu à proliferação desta linhagem nos tempos analisados. Observa-se ainda, células arredondadas somente no tempo de 24 horas (1D) por sobre o cultivo celular, ausência destas nos tempos de 48 e 72 h (1E e 1F, respectivamente).

Para o tratamento com o biomaterial BO (Figuras 1G a 1I), após 24 h (1G), 48 h (1H) e 72 h (1I), as células tratadas apresentaram em todos os tempos analisados o menor número de células, quando comparadas ao C, e em especial ao biomaterial BP. Chama atenção que já para o tempo de 24 h (1G), ao comparar-se ao C (1A), vê-se alteração do padrão morfológico destas células: o corpo celular está mais globoso ou volumoso, as células estão menores do que o padrão de células alongadas, menos afiladas, por passarem a estar mais

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

globosas. Isso sugere que estão perdendo a capacidade de se espriar por sobre o substrato. Possivelmente devam estar perdendo adesão celular. Assim, sabendo-se que células que perdem adesão ao substrato induzem mecanismo de morte celular por desalojamento, mecanismo conhecido por ANOIKIS , os resultados observados nas Figuras 1G (24 h), 1H (48 h) e 1I (72 h) evidenciam esta suposição. Vê-se um menor número de células em todos os tempos analisados. Quando comparadas as Figuras das células do C (1A, 1B e 1C) com as células expostas ao BO (1G, 1H e 1I), estas não atingiram a confluência, mesmo no tempo de 72h (1I).



**Figura 1** - Análise morfológica em microscopia de luz (ML) das células-tronco mesenquimais, nos grupos C (controle) e expostas aos biomateriais BP (Bone Fill Porous®) e BO (Bio-Oss®) por 24, 48 e 72 horas, iniciando com  $2 \times 10^4$  células por poço. Estes ensaios foram realizados em duplicatas biológicas de triplicatas. As figuras 1A, 1B e 1C evidenciam

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A.  
 Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

células *C* mantidas em (DMEM). As figuras 1D, 1E e 1F evidenciam células BP. As figuras 1G, 1H e 1I evidenciam células BO. Todas as imagens em 20 ×. **Setas:** 1 = células aderidas e espreiadas ao substrato; 2 = células com diferentes padrões morfológicos; 3 = inibição de contato; 4 = células em subconfluência; 5 = células arredondadas; 6 = células mais alongadas (filiformes), espreiadas e aderidas ao substrato; 7 = células em confluência; 8 = células em subconfluência.

### *3.3.4 Análise morfológica e ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células C e BP*

As análises em MEV (Figura 2) demonstraram que as células *C* (Figuras 2A a 2D), após 72 h, apresentaram-se: aderidas e espreiadas ao substrato, com diferentes padrões morfológicos, com características de inibição por contato, ou seja, células que não se empilharam e que se mantiveram dispostas lado a lado. Também pode-se observar células em subconfluência evidente, com projeções do corpo celular e distintas morfologias, como filopódios por toda borda do corpo celular, estruturas de percepção celular. Vê-se por sobre o cultivo (Figuras 2A e 2B), células de menor tamanho e arredondadas, características de células mortas ou em processo de divisão celular. Há por sobre o corpo celular material vesicular semelhante a processos de secreção celular, bem como material particulado.

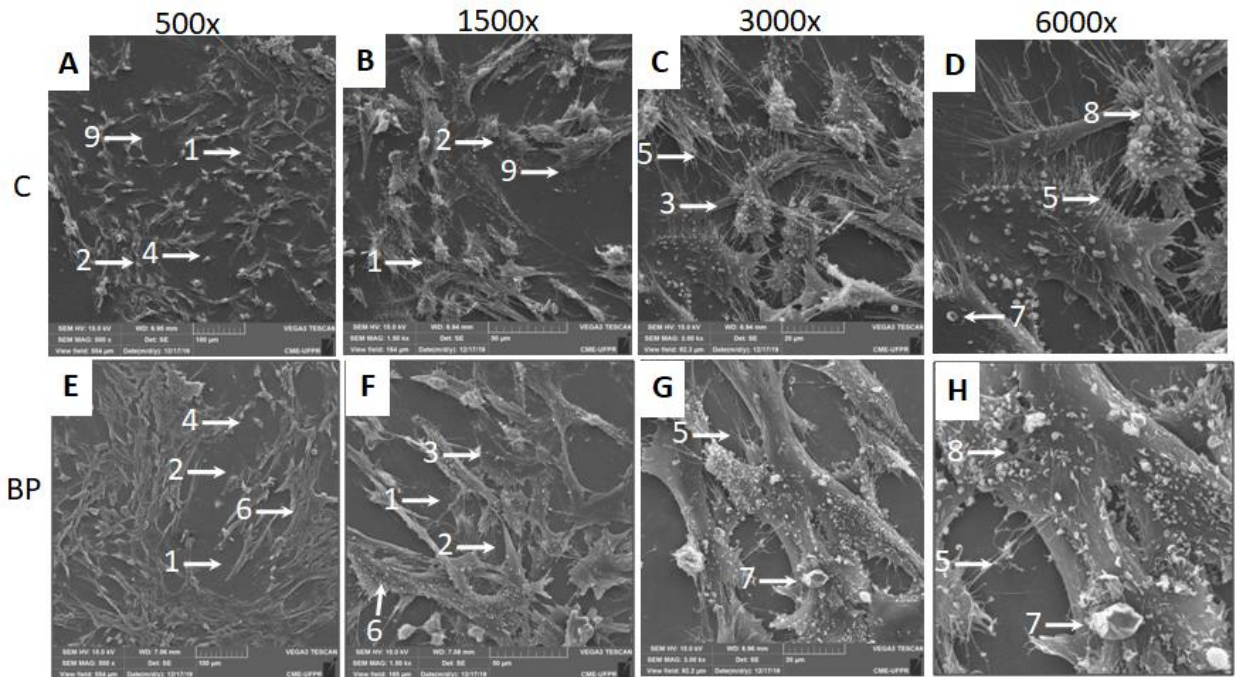
As Figuras 2E a 2H são células BP em 72 h, evidenciando respostas semelhantes às células *C*. Representam células que se mantiveram aderidas e espreiadas ao substrato, com diferentes padrões morfológicos, que também não se empilham, ficando lado a lado. Estas emitem características projeções do corpo celular, e distintas morfologias.

De forma interessante, pode-se observar que as células BP (Figuras 2E, 2F e 2G) são maiores que as *C* (Figuras 2A, 2B e 2C). Alongaram mais o corpo celular, passaram a emitir poucas e esparsas projeções membranares e filopódios. Observa-se ainda, material

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).



particulado de diferentes tamanhos por sobre o cultivo celular, bem como abundantes processos vesiculares, semelhante a processos de secreção celular.



**Figura 2** - Análise em MEV das células-tronco *C* e BP, em 72 h, na concentração de  $2 \times 10^4$ . As figuras 2A, 2B, 2C e 2D evidenciam células *C*. As figuras 2E a 2H evidenciam células BP. As figuras 2A e 2E são imagens em  $500 \times$ . As figuras 2B e 2F tem  $1500 \times$ . As figuras 2C e 2G estão em  $3000 \times$ . As figuras 2E, 2D e 2H em  $6000 \times$ . Estes ensaios foram realizados em duplicatas biológicas de triplicatas. **Setas:** 1 = células aderidas e espraiadas ao substrato; 2 = células com diferentes padrões morfológicos; 3 = inibição de contato; 4 = células em subconfluência; 5 = projeções celulares na forma de filopódios; 6 = células maiores com morfologia mais alongadas; 7 = material particulado de diferentes tamanhos por sobre o cultivo celular; 8 = células com abundantes processos vesiculares, semelhante a processos de secreção celular; 9 = menor número de células, células menores, menos espraiadas, com maior número de células arredondadas.

### 3.4 DISCUSSÃO

Células-tronco mesenquimais podem apresentar grande potencial osteogênico, sendo este um fator que pode ser considerado importante, especialmente quando se necessita de reconstruções ósseas maiores, para reabilitações com implantes dentários. Com o aumento

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A.  
 Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

da disponibilidade de biomateriais xenogênicos para fins de enxertia, e sabendo-se que a aplicação clínica das células-tronco poderia ser uma estratégia para melhoria do desempenho dos enxertos, torna-se relevante avaliar a influência dos biomateriais sobre estas, antes de estudos *in vivo* e/ou em humanos (Wolf *et al.*, 2015; Zimmermann *et al.*, 2015).

No presente trabalho, foram usados biomateriais particulados dentro de insertos, a fim de se evitar uma mistura direta destes com as células que foram cultivadas convencionalmente, no fundo dos poços, facilitando a recuperação destas para avaliação, mas permitindo a exposição ao biomaterial, diferentemente dos ensaios de migração celular, em que o biomaterial fica no fundo do poço e as células no inserto (Wang *et al.*, 2018). Esta metodologia permitiu o cultivo celular na presença dos biomateriais, e deve continuar nos próximos trabalhos em tempos maiores até que seja possível a observação de diferenciação.

Como podem ocorrer resultados divergentes dependendo do ensaio realizado, faz-se necessário a realização de diferentes testes básicos, como a citotoxicidade, proliferação celular e viabilidade (Chiba *et al.*, 1998). Estes testes geram parâmetros e fornecem respostas conjuntas que vão complementar os resultados e diminuir a chance de viés sobre citotoxicidade e proliferação celular (Chiba *et al.*, 1998).

O ensaio MTT refere-se à citotoxicidade. Neste ensaio o reagente entra em contato com as mitocôndrias, sendo processado e metabolizado por enzimas presentes na matriz mitocondrial. Quanto maior for a absorvância da espectrofotometria, menor é a citotoxicidade do composto sobre as células (Lu. L *et al.* 2012; Gomez *et al.* 2017). Durante os períodos iniciais de 24 e 48 h, os resultados do teste MTT foram praticamente iguais entre os grupos. Em 72 h, o grupo BP se comportou como o grupo BO, mas com desempenho

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

menor do que o C. Vasilyev et al. (2018), diferentemente do presente projeto, demonstraram citotoxicidade para o biomaterial BO.

Quanto à viabilidade com o vermelho neutro, de acordo com metodologia semelhante a trabalhos anteriores (Repetto *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2017); porém, percebeu-se que o grupo BP iniciou o teste com os menores valores, e igualou os resultados dos outros grupos em até 72 h. O trabalho de Rasch et al. (2019), também utilizam os períodos de 24 e 72 h. No entanto, neste mesmo trabalho de Rasch *et al.* (2019), as células-tronco foram colocadas diretamente sobre a superfície dos biomateriais, o que resultou numa menor taxa de viabilidade do Bio-Oss®. Pode também ter havido migração celular para dentro do corpo do biomaterial, e essas células por se diferenciarem, provocam um resultado falso positivo.

Quanto à proliferação celular, os resultados foram combinados e forneceram dados significantes a partir das médias globais. Os resultados em 72 h foram mais favoráveis aos grupos C e BP. No trabalho de Hosseini *et al.* (2019), o Bio-Oss® revestido por policaprolactona fornece uma superfície que estimula a proliferação celular, diferente do trabalho atual, em que a influência celular do Bio-Oss® puro não apresentou o melhor desempenho.

Em relação aos aspectos morfológicos à ML, nitidamente, o aspecto das células do grupo BP foi distinto, tanto do grupo C quanto do BO. Pode-se perceber uma proliferação maior no BP do que no BO (médias totais com diferença significativa), sendo que no grupo BO, o processo de desalojamento (ANOIKIS) foi observado. No trabalho de Hosseini *et al.* (2019), o aspecto morfológico das células-tronco usadas (do tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical) é realmente diferente das células-tronco de dentes decíduos usadas neste trabalho. Hosseini *et al.* (2019) também usam um biomaterial xenogênico, o Bio-Oss®, mas

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

revestido de um polímero - neste caso um gráfico demonstra um aumento na proliferação celular na presença do Bio-Oss.

Assim, por conta do aspecto morfológico à ML e da proliferação celular, decidiu-se avaliar este grupo à MEV apenas em 72 h. À ML, o que parecia ser um cultivo de células já em confluência, à MEV, neste tempo, percebeu-se que as células ainda estavam em subconfluência, uma vez que era possível observar espaços entre as células. Outro ponto dependente da microscopia é a inibição por contato, que à MEV não fica evidente. Parameswaran & Verma (2011) descrevem formações vesiculares nodulares osteogênicas na superfície de células-tronco de medula óssea, semelhantemente aos achados do atual trabalho, cujas células apresentaram muitas secreções nodulares. As células maiores, mais alongadas, com poucas e esparsas projeções membranares; além dos espraiamentos e profusa interação ao substrato indicam que as SHEDs estavam mantendo uma alta viabilidade celular, ou seja, a presença do biomaterial não exerceu efeito citotóxico, podendo provavelmente ser associado a células-tronco tipo SHED numa terapia celular avançada.

Ainda, estes resultados que se mostraram interessantes junto ao biomaterial xenogênico, corroboram para o seu uso, uma vez que o produto é nacional e o leva a patamares melhores de menores custos.

De forma promissora o grupo BP mostrou melhores resultados de proliferação quando que comparado ao BO. Também evidenciou células maiores mais alongadas, espraiadas em íntimo contato com o substrato, quando comparadas às células do grupo C. Assim se faz pertinente prosseguir com demais ensaios para avaliar real potencial deste biomaterial.

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

### 3.5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que os biomateriais xenogênicos avaliados no presente trabalho influenciaram positivamente as células-tronco mesenquimais frente aos ensaios de viabilidade, citotoxicidade e proliferação celulares. Bem como manutenção de suas características morfológicas e ultraestruturais. Estas se mantiveram viáveis sem ação citotóxica com manutenção da capacidade proliferativa. Logo, pode-se concluir que o BP apresentou maior potencial carreador de células-tronco para futuros trabalhos com aplicação *in vivo* e/ou clínica.

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

## REFERÊNCIAS

1. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014 Dec;13(4):464-70. doi: 10.1007/s12663-013-0554-z. Epub 2013 Aug 2
2. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017 Dec;3(1):23. doi: 10.1186/s40729-017-0084-4. Epub 2017 Jun 1.
3. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.
4. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S16-21. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.199. Epub 2011 Sep 1.
5. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic

Manuscrito será submetido ao periódico: *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.  
Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

review. Clin Oral Implants Res. 2012 Mar;23(3):263-73. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02168.

6. Hämmerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. Clin Oral Implants Res. 2001 Feb;12(1):9-18.

7. Shen JF, Sugawara A, Yamashita J, Ogura H, Sato S. Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues. Int J Oral Sci. 2011 Jul;3(3):117-24. doi: 10.4248/IJOS11044.

8. Carvalho Acc., Goldenberg Rcs., Células-tronco Mesenquimais: Conceitos, métodos de obtenção e aplicações. São Paulo: EditoraAtheneu, 2012.

9. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. J Prosthodont Res. 2012 Jul;56(3):151-65. doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001. Epub 2012 Jul 15.

10. Kishimoto N, Honda Y, Momota Y, Tran SD. Dedifferentiated Fat (DFAT) cells: A cell source for oral and maxillofacial tissue engineering. Oral Dis. 2018 Oct;24(7):1161-1167. doi: 10.1111/odi.12832. Epub 2018 Apr 24.

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

11. Rosa V., Dubey N., Islam I., Min K.S., Nör J.E. Pluripotency of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:5957806. <https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/5957806/>
12. Zimmermann A, Pelegri AA, Peruzzo D, Martinez EF, de Mello e Oliveira R, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose mesenchymal stem cells associated with xenograft in a guided bone regeneration model: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015 Nov-Dec;30(6):1415-22. doi: 10.11607/jomi.4164.
13. Wolf MT, Vodovotz Y, Tottey S, Brown BN, Badylak SF. Predicting in vivo responses to biomaterials via combined in vitro and in silico analysis. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 Feb;21(2):148-59. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0167. Epub 2014 Aug 4.
14. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* 2017 Apr;50(2). doi: 10.1111/cpr.12334. Epub 2017 Feb 1.
15. Wang B, Guo Y, Chen X, et al. Nanoparticle-modified chitosan-agarose-gelatin scaffold for sustained release of SDF-1 and BMP-2. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:7395-7408. Published 2018 Nov 12. doi:10.2147/IJN.S180859

Manuscrito será submetido ao periódico: *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.  
Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).



16. Chiba, K ; Kawakami, K ; Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 1998, Vol.12(3), pp.251-258
17. Repetto G. , A. del Peso, J.L. Zurita. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity *Nat. Protoc.*, 3 (2008), pp. 1125-1131
18. Lü L., L. Zhang, M.S.M. Wai, D.T.W. Yew, J. Xu. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol. in Vitro*, 26 (2012), pp. 636-644
19. Vasilyev AV, Zorina OA, Magomedov RN, et al. Razlichiiia tsitosovmestimosti kostno-plasticheskikh materialov iz ksenogenogo gidroksiapatita s mul'tipotentnymi mezenkhimal'nymi stromal'nymi kletkami, poluchennymi iz pul'py vypavshikh molochnykh zubov i podkozhnogo lipoaspirata [Differences in the cytocompatibility of bone-plastic materials from xenogeneic hydroxyapatite with stem cells from human exfoliated deciduous teeth and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells]. *Stomatologiya (Mosk)*. 2018;97(3):7-13. doi:10.17116/stomat20189737
20. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218404. Published 2019 Jun 20. doi:10.1371/journal.pone.0218404

Manuscrito será submetido ao periódico: *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.  
Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

21. Hosseini FS, Soleimanifar F, Ardeshirylajimi A, Vakilian S, Mossahebi-Mohammadi M, Enderami SE, Khojasteh A, Zare Karizi S. In vitro osteogenic differentiation of stem cells with different sources on composite scaffold containing natural bioceramic and polycaprolactone. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019 Dec;47(1):300-307. doi: 10.1080/21691401.2018.1553785.
22. Qu X, Wan Y, Zhang H, Cui W, Bei J, Wang S. Porcine-derived xenogeneic bone/poly(glycolide-co-lactide-co-caprolactone) composite and its affinity with rat OCT-1 osteoblast-like cells. *Biomaterials.* 2006;27(2):216-225. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.101
23. Parameswaran S, Verma RS. Scanning electron microscopy preparation protocol for differentiated stem cells. *Anal Biochem.* 2011;416(2):186-190. doi:10.1016/j.ab.2011.05.032

Manuscrito será submetido ao periódico: Journal of Biomedical Materials Research Part A. Manuscrito formatado de acordo com as normas específicas do periódico (acessado em: 21/02/2020).

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ambos os biomateriais mantiveram citotoxicidade e viabilidade celular e semelhantes ao grupo C; houve diferença para menor no grupo BO quanto à proliferação; o grupo BP apresentou células mais espariadas e aderidas do que o grupo BO à microscopia de luz; e ao MEV, as células do grupo BP apresentaram características de células mais ativas do que as do grupo C, com secreção de vesículas para a matrix extracelular. Pode-se concluir que o BP apresentou maior potencial carreador de células-tronco para futuros trabalhos com aplicação *in vivo* e/ou clínica.

## REFERÊNCIAS

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.

Aghajani, F.; Hooshmand, T.; Khanmohammadi, M.; Khanjani, S.; Edalatkhah, H.; Zarnani, A.H.; Kazemnejad, S. Comparative Immunophenotypic Characteristics, Proliferative Features, and Osteogenic Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Permanent and Deciduous Teeth with Bone Marrow. *Mol. Biotechnol.* 2016, 58, 415–427.

Buduru SD, Gulei D, Zimta AA, Tigu AB, Cenariu D, Berindan-Neagoe I. The Potential of Different Origin Stem Cells in Modulating Oral Bone Regeneration Processes. *Cells.* 2019 Jan 8;8(1). pii: E29. doi: 10.3390/cells8010029.

Byung Cheol Kim,1,2 Jae-In Song,1,2 Kyoung-Ha So,1,2 and Sang-Hwan Hyun1,2. Effects of lysophosphatidic acid on human periodontal ligament stem cells from teeth extracted from dental patients. *J Biomed Res.* 2019; 33(2): 122–1

Carvalho Acc., Goldenberg Rcs., Células-tronco Mesenquimais: Conceitos, métodos de obtenção e aplicações. São Paulo: EditoraAtheneu, 2012.

Chiba, K ; Kawakami, K ; Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 1998, Vol.12(3), pp.251-258

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I:

stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 Jul;56(3):151-65. doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001. Epub 2012 Jul 15.

Estrela, C.; Alencar, A.H.; Kitten, G.T.; Vencio, E.F.; Gava, E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: Perspectives for tissue regeneration. *Braz. Dent. J.* 2011, 22, 91–98.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):150-4. Epub 2006 Feb 20.

Feng F, Akiyama K, Liu Y, et al. Utilidade de progenitores de PDL para regeneração tecidual in vivo: relato de 3 casos [J]. *Oral Dis* , 2010, 16 ( 1 ): 20–28

Hämmerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Feb;12(1):9-18.

Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* 2017 Apr;50(2). doi: 10.1111/cpr.12334. Epub 2017 Feb 1.

Hosseini FS, Soleimanifar F, Ardeshirylajimi A, Vakilian S, Mossahebi-Mohammadi M, Enderami SE, Khojasteh A, Zare Karizi S. In vitro osteogenic differentiation of stem cells with different sources on composite scaffold containing natural bioceramic and polycaprolactone. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019 Dec;47(1):300-307. doi:

10.1080/21691401.2018.1553785.

Ichiyanagi, T.; Anabuki, K.; Nishijima, Y.; Ono, H. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow wastes of spinal fusion procedure (TLIF) for low back pain patients and preparation of bone dusts for transplantable autologous bone graft with a serum glue. *Biosci. Trends* 2010, 4, 110–118.

Iwata T, Yamato M, Zhang Z, et al. Validação de células derivadas do ligamento periodontal humano como fonte confiável para uso citoterapêutico [J]. *J Clin Periodontol* , 2010, 37 ( 12 ): 1088-1099.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Mar;23(3):263-73. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02168.

Jin Q, Yuan K, Lin W, Niu C, Ma R, Huang Z. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019 Dec;47(1):1577-1584. doi: 10.1080/21691401.2019.1594861.

Kishimoto N, Honda Y, Momota Y, Tran SD. Dedifferentiated Fat (DFAT) cells: A cell source for oral and maxillofacial tissue engineering. *Oral Dis.* 2018 Oct;24(7):1161-1167. doi: 10.1111/odi.12832. Epub 2018 Apr 24.

Lü L., L. Zhang, M.S.M. Wai, D.T.W. Yew, J. Xu. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol. in Vitro*, 26 (2012), pp. 636-644

Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg*. 2014 Dec;13(4):464-70. doi: 10.1007/s12663-013-0554-z. Epub 2013 Aug 2

Miura M, S. Gronthos, M. Zhao et al., “SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 10, pp. 5807–5812, 2003

Niada S, Ferreira LM, Arrigoni E, Addis A, Campagnol M, Broccaioli E, Brini AT. Porcine adipose-derived stem cells from buccal fat pad and subcutaneous adipose tissue for future preclinical studies in oral surgery. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(6):148.

Parameswaran S, Verma RS. Scanning electron microscopy preparation protocol for differentiated stem cells. *Anal Biochem*. 2011;416(2):186-190. doi:10.1016/j.ab.2011.05.03

Peñarrocha-Diago M, Alonso-González R, Aloy-Prósper A, Peñarrocha-Oltra D, Camacho F, Peñarrocha-Diago M. Use of buccal fat pad to repair post-extraction peri-implant bone defects in the posterior maxilla. A preliminary prospective study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 Nov 1;20(6):e699-706.

Qu X, Wan Y, Zhang H, Cui W, Bei J, Wang S. Porcine-derived xenogeneic bone/poly(glycolide-co-lactide-co-caprolactone) composite and its affinity with rat OCT-1 osteoblast-like cells. *Biomaterials*. 2006;27(2):216-225. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.101

Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218404. Published 2019 Jun 20. doi:10.1371/journal.pone.0218404

Rezai Rad M, Bohlooli M, Akhavan Rahnama M, Anbarlou A, Nazeman P, Khojasteh A. Impact of Tissue Harvesting Sites on the Cellular Behaviors of Adipose-Derived Stem Cells: Implication for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2017;2017:2156478. doi:10.1155/2017/2156478. Epub 2017 Dec 14.

Repetto G. , A. del Peso, J.L. Zurita. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity *Nat. Protoc.*, 3 (2008), pp. 1125-1131

Rosa V. , “What and where are the stem cells for dentistry? *Singapore Dental Journal*, vol. 34, no. 1, pp. 13–18, 2013.

Rosa V., Dubey N., Islam I., Min K.S., Nör J.E. Pluripotency of Stem Cells from Human



Exfoliated Deciduous Teeth for Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:5957806.  
<https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/5957806/>

Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017 Dec;3(1):23. doi: 10.1186/s40729-017-0084-4. Epub 2017 Jun 1.

Salehi-Nik N, Rezai Rad M, Kheiri L, Nazeman P, Nadjmi N, Khojasteh A. Buccal Fat Pad as a Potential Source of Stem Cells for Bone Regeneration: A Literature Review. *Stem Cells Int.* 2017;2017:8354640. doi: 10.1155/2017/8354640. Epub 2017 Jul 5.

Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Aug;106(2):203-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.12.001. Epub 2008 Apr 18.

Shen JF, Sugawara A, Yamashita J, Ogura H, Sato S. Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues. *Int J Oral Sci.* 2011 Jul;3(3):117-24. doi: 10.4248/IJOS11044.

Trubiani O, Piattelli A, Gatta V, et al. Avaliação de um sistema eficiente de cultura sem xeno de células-tronco do ligamento periodontal humano [J]. *Tissue Eng Part C Methods* , 2015, 21 ( 1 ): 52–64.

Vasilyev AV, Zorina OA, Magomedov RN, et al. Razlichiiia tsitosovmestivosti kostno-plasticheskikh materialov iz ksenogenogo gidroksiapatita s mul'tipotentnymi mezenkhimal'nymi stromal'nymi kletkami, poluchennymi iz pul'py vypavshikh molochnykh zubov i podkozhnogo lipoaspirata [Differences in the cytocompatibility of bone-plastic materials from xenogeneic hydroxyapatite with stem cells from human exfoliated deciduous teeth and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells]. Stomatologiya (Mosk). 2018;97(3):7-13. doi:10.17116/stomat20189737

Yang, H.; Gao, L.N.; An, Y.; Hu, C.H.; Jin, F.; Zhou, J.; Jin, Y.; Chen, F.M. Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. Biomaterials 2013, 34, 7033–7047.

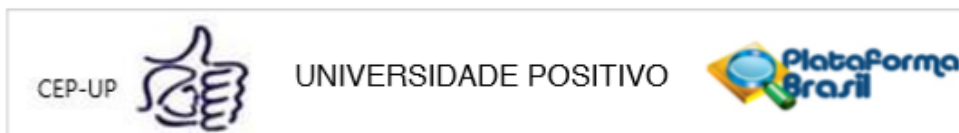
Wang B, Guo Y, Chen X, et al. Nanoparticle-modified chitosan-agarose-gelatin scaffold for sustained release of SDF-1 and BMP-2. Int J Nanomedicine. 2018;13:7395-7408. Published 2018 Nov 12. doi:10.2147/IJN.S180859

Wolf MT, Vodovotz Y, Tottey S, Brown BN, Badylak SF. Predicting in vivo responses to biomaterials via combined in vitro and in silico analysis. Tissue Eng Part C Methods. 2015 Feb;21(2):148-59. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0167. Epub 2014 Aug 4.

Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. Injury. 2011 Sep;42 Suppl 2:S16-21. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.199. Epub 2011 Sep 1.

Zimmermann A, Pelegrine AA, Peruzzo D, Martinez EF, de Mello e Oliveira R, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose mesenchymal stem cells associated with xenograft in a guided bone regeneration model: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015 Nov-Dec;30(6):1415-22. doi: 10.11607/jomi.4164.

## ANEXO 1 (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** INFLUÊNCIA DE BIOMATERIAL XENOGÊNICO SOBRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ORIUNDAS DO CORPO ADIPOSEO DE BICHAT

**Pesquisador:** JOÃO CÉSAR ZIELAK

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 13434019.7.0000.0093

**Instituição Proponente:** CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES POSITIVO LTDA

**Patrocinador Principal:** CURITIBA BIOTECNOLOGIA LTDA - ME

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.837.307

#### Apresentação do Projeto:

Serão realizados nesse estudo células aderentes do tecido adiposo da bola de Bichat obtido de bichectomia.

Serão realizados testes em placas de

24 poços, em triplicatas de 4. Após confluência (70%), as células serão lavadas em PBS a 37 °C, desaderidas quimicamente, contadas em Câmara de Neubauer, sendo 8 x 10<sup>3</sup> células plaqueadas por poço, de acordo com os seguintes grupos: Grupo Controle negativo (GCN = células-tronco mesenquimais puras, CTM) Grupo Teste (GT = CTM e Bonefill Porous®) e Grupo Controle positivo (GCP = CTM e Stem Pro®).

Todos os grupos

serão subdivididos em mais 3 grupos para avaliação aos 7, 14 e 21 dias

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar in vitro a influência de biomaterial xenogênico sobre células-tronco provenientes da bola adiposa de Bichat.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta envolve apenas o descarte da cirurgia de bichectomia, ou seja não há riscos diretos no procedimento. No entanto, qualquer problema ou desconforto, dor leve, moderada ou intensa advinda do procedimento será imediatamente sanado pelo cirurgião e ou equipe envolvida, sem qualquer custo para o participante da pesquisa.

**Endereço:** Rua Profª Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300  
**Bairro:** Campo Comprido **CEP:** 81.280-300  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3317-3260 **Fax:** (41)3317-3030 **E-mail:** cep@up.edu.br



UNIVERSIDADE POSITIVO



Continuação do Parecer: 3.637.307

**Benefícios:**

Os participantes terão acesso a todas as informações desta pesquisa, e estarão colaborando para o desenvolvimento de técnicas que podem possibilitar o aproveitamento das células, que normalmente são jogadas fora em procedimentos indicados

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

pesquisa de relevância

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendo a sua aprovação

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_151023_0_E1.pdf	12/02/2020 10:14:13		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉadendoCEP.doc	12/02/2020 10:13:51	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALÉadendoCEP.doc	12/02/2020 10:13:31	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Declaração de concordância	anuenciadoc.pdf	11/02/2020 22:06:50	JOAO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	adendojef.pdf	11/02/2020 22:03:33	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_xenog_CEP.pdf	08/05/2019 23:31:36	JOAO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	TD_fragmentos_CEP.pdf	08/05/2019 23:31:24	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito

Endereço: Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300  
Bairro: Campo Comprido CEP: 81.280-300  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3317-3260 Fax: (41)3317-3030 E-mail: cep@up.edu.br



UNIVERSIDADE POSITIVO



Continuação do Parecer: 3.637.307

Biobanco	TD_fragmentos_CEP.pdf	08/05/2019 23:31:24	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_xenog_CEP.pdf	08/05/2019 23:30:40	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_xenoge_CEP.pdf	08/05/2019 23:30:13	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_xenog_CEP.pdf	08/05/2019 23:29:37	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 13 de Fevereiro de 2020

---

**Assinado por:**  
**Wellington Menyrval Zaitter**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300  
**Bairro:** Campo Comprido **CEP:** 81.280-300  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3317-3260 **Fax:** (41)3317-3030 **E-mail:** cep@up.edu.br

Página 03 de 03