NATACHA KALLINE DE OLIVEIRA

**Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células
tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas de
poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano)**

São Paulo

2016

NATACHA KALLINE DE OLIVEIRA

**Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células
tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas de
poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano)**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Oliveira, Natacha Kalline de.

Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) / Natacha Kalline de Oliveira ; orientadora Maria Cristina Zindel Deboni. -- São Paulo, 2016.

97 p. : fig., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão Corrigida

1. Polpa dentária. 2. Células-tronco. 3. Biomateriais poliméricos. I. Deboni, Maria Cristina Zindel. II. Título.

Oliveira NK. Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Romeu e Dulci,
Cujo apoio incondicional tornam meus sonhos realidades.

À minha orientadora, Cristina Deboni,
Professora na qual me inspiro.

AGRADECIMENTOS

Aos **meus pais**, por sempre tentar compreender minha ausência durante a minha caminhada em busca dos meus sonhos, mesmo que isso tenha significado muitas vezes o sofrimento de ambas as partes. Obrigada pela generosidade e por serem meu porto seguro.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni** por ter me acolhido do Departamento de Cirurgia e confiado esse trabalho. Pela paciência, diligência, exemplo, ensinamentos e amizade.

À **Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem**, por ter me oferecido a oportunidade de fazer parte do grupo de Pós Graduação em Cirurgia da FOUSP, do qual tenho muito orgulho em participar. Agradeço também pelas lições, e conselhos, que sem dúvida contribuíram muito para a minha formação.

À **Dra. Vera Pozzani** pelas orientações, conselhos e amizade.

À **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, a qual teve papel muito importante como coorientadora na elaboração e desenvolvimento desse trabalho e também na minha aprendizagem no laboratório de cultura celular.

Ao **Prof. Dr. Marcos Akira D'ávila** e sua aluna **Tais Helena Costa Salles**, por nos ter confiado a utilização da membrana de PCL/poli(rotaxano) para a realização desse trabalho.

À **Profa. Dra. Carla Renata Sipert**, contemporânea na época de minha graduação na FOB-USP, foi um prazer poder dispor da sua ajuda, durante a pós graduação.

À **Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva**, pelas sugestões relevantes dadas a esse trabalho durante o exame de Qualificação.

Ao **Prof. Dr. Rubens Guimarães Filho**, que muito me apoiou no início de minha caminhada me norteando e estimulando a seguir a carreira como cirurgiã bucomaxilofacial. Obrigada pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Renato Mazzonetto** (*in memoriam*), de quem trago boas recordações e muitos ensinamentos. Suas palavras me influenciaram e influenciam até hoje a seguir a carreira acadêmica.

Aos professores da disciplina de Cirurgia, **Prof. Dr. Marcos Vianna Gayotto, Profa. Dra. Andréia Aparecida Traina Hanna, Prof. Dr. Fernando Melhem Elias, Profa. Dra. Marina Cleia Palo Prado, Prof. Dr. José Luiz Piratininga, Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz**, pela oportunidade de convivência em ambiente profissional e por todos os ensinamentos.

Ao **Prof. Daniel Isaac Sendyk**, pela amizade, companheirismo e motivação durante esses anos de convivência na pós graduação.

Aos amigos da pós graduação, **Yuri Slusarenko da Silva, Natália Caroline Aguiar Tartaroti, Mariana Aparecida Brozski, Vitor Pereira Rodrigues, Ricardo Pimenta D'ávila, Milton de Siqueira Ferreira Anzaloni Saavedra, Ana Paula da Cunha Barbosa de Lima, Matheus Furtado Rubens Carmino Junior, Marcello Roberto Manzi, Alex de Freitas Rodrigues**, pelos trabalhos em equipe, amizade e pelos momentos de descontração durante nossa jornada nesse curso.

Às minhas queridas amigas, irmãs que há tempos me apoiam nessa trajetória **Marcela Charantola Rodrigues, Priscila Garcia, Larissa Moreno, Andressa Marques**. Com certeza, sem a amizade de vocês, eu não teria chegado até aqui.

Às amigas de Guarulhos, **Vanessa Florit, Manuela Teodosio e Juliana Valles**, cujo apoio e amizade, com certeza me possibilitaram a melhor realização desse trabalho.

A **Profa. Dra. Gabriela Mayrink**, amiga muito especial, uma inspiração e um exemplo de profissional a seguir.

Às amigas **Ana Clara Pedroni e Gabriela Abe**, sem as quais com certeza não seria possível concluir esse trabalho. Obrigada pela paciência, amizade, conselhos, ensinamentos no laboratório e palavras de motivação.

Às minhas “roommates” **Carina Tanaka e Stéfany Karkuszewski**, pelos momentos de descontração e companheirismo.

Aos funcionários do departamento de Cirurgia: **Aparecida Conceição de Souza, Edison Henrique Vicente, Natália Conceição Afonso, Roseli de Andrade**. E do departamento de Dentística: **Débora de Oliveira, Sônia Aparecida Grigio e Selma Santi**. Obrigada por todo tempo despendido, dedicação e ajuda durante esse período.

Aos **Alunos de Iniciação Científica e graduação** com os quais tive oportunidade de conviver nesse período e com quem muito aprendi e tenho aprendido.

Aos **pacientes da FOUSP**, agradeço a confiança, sem eles com certeza não existiriam clínica, pesquisa ou sequer os cursos de graduação e pós graduação. Muito Obrigada

À todos os **preceptores, amigos e funcionários que me acompanharam durante minha Residência** em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais no **Hospital Municipal do Campo Limpo**, pelo apoio e encorajamento à seguir essa carreira que tanto amo.

À **FOUSP**, em nome do **Diretor Prof. Dr. Waldyr Jorge**, pelo suporte tanto em infraestrutura quanto técnico durante o curso de mestrado.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que com a bolsa auxílio pesquisa nos possibilitou a efetiva realização desse trabalho.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior, que me ofereceu uma bolsa de estudos

Ao **Laboratório de Pesquisa Básica** da FOUSP, em nome da **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, por todo o suporte para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **IPEN**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, mais especificamente ao **Dr. Pablo Vasquez** do Centro de Tecnologia das Radiações – CTR, pela ajuda com a esterilização da membrana polimérica utilizada em nosso trabalho.

Ao **Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia (IB)** pelo auxílio técnico nos testes de Citometria de Fluxo, em particular à bióloga **Renata Rossetti**.

Ao **Laboratório de Caracterização Tecnológica-LCT** do Depto. De Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP, especialmente ao Geólogo **Renato Contessotto** pela aquisição das imagens através da MEV.

Ao serviço de **biblioteca da FOUSP**, mais especificamente à **Glauci Elaine Damásio Fidelis**, pela atenção e dedicação durante a correção dessa dissertação.

E a **Faculdade de Odontologia de Bauru** da Universidade de São Paulo (FOB-USP), onde tudo começou.

“Para fazer algo bem feito é necessário: primeiro, o amor, segundo, a técnica.”

Antoni Gaudí

RESUMO

Oliveira NK. Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

A busca por um material de enxertia que se adapte às necessidades do cirurgião bucomaxilofacial e também que proporcione ao paciente retorno de sua função com menores danos possíveis, tem sido incessante. O enxerto autógeno é ainda hoje considerado padrão ouro devido suas propriedades, porém, ele apresenta algumas desvantagens, sendo que as maiores de suas complicações estão associadas ao leito doador. Atualmente, a engenharia de biomateriais trabalha com o desenvolvimento de novos materiais e recursos principalmente na área de regeneração tecidual. Neste contexto, scaffolds de origem natural ou sintética com o propósito de promover a regeneração de tecidos tem sido amplamente estudados. O objetivo desse estudo foi avaliar in vitro o comportamento biológico quanto à viabilidade, proliferação celular, adesão e potencial de diferenciação de células tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre amostras de scaffold composto por uma nova blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). Células tronco de polpa dentária de molares humanos (hDPSCs) foram cultivadas a partir de amostras congeladas e re-caracterizadas. As células foram semeadas sobre amostras dos scaffolds e sob lamínulas de vidro e cultivadas em diferentes meios: clonogênico, mineralizante e condicionado pelo extrato do biomaterial por 1,3,7,14 e 21 dias. Foram avaliadas as curvas de crescimento e viabilidade celulares, a atividade de fosfatase alcalina, a formação de nódulos de mineralização. A adesão celular foi observada por microscopia eletrônica de varredura até o cultivo de 7 dias. Os scaffolds eram lisos, flexíveis e mostraram-se anfifílicos com características físicas de fibras dispostas aleatoriamente e poros interconectados com diâmetro médio de $13,5\mu\text{m}$ e abertura com área média de $87,14\mu\text{m}^2$. As hDPSCs expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. Não houve inibição de crescimento celular na interface com o biomaterial. As curvas de crescimento e viabilidade mostraram-se mais significativas ($p<0.01$), especialmente em 7 dias, para as culturas sobre os scaffolds

em meio clonogênico. Resultados semelhantes foram observados com o meio mineralizante ($p < 0.05$). Houve maior formação de nódulos de mineralização nas culturas com a presença dos scaffolds, ou seja, o biomaterial estimulou a diferenciação celular. Em microscopia eletrônica de varredura as células mostraram-se aderidas até o período de 7 dias com formação de lençóis sobre os scaffolds. A blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) apresentou biocompatibilidade in vitro, revelando aspectos promissores de serem funcionalizadas por células tronco derivadas de polpa dentária humana com potencial de uso como biomaterial bioativo para bioengenharia de tecido ósseo.

Palavras-chave: Polpa dentária. Células-tronco. Biomateriais poliméricos.

ABSTRACT

Oliveira NK. Assessment of the feasibility, proliferation and osteogenic potential of stem cells from human dental pulp cultured on poly ϵ -caprolactone / poly (rotaxane) membranes. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida

The search for a graft material that provides patient with rehabilitation with little damage and also suits maxillofacial surgeon needs has been incessant. Autogenous bone is still considered the gold standard for grafting because of its properties, although it has some disadvantages and the majority of its complications are associated with the donor site. Currently, bioengineering develops new materials and resources primarily for tissue regeneration area. In this context, scaffolds of natural or synthetic origin with the purpose of promoting tissue regeneration have been widely studied. The aim of this study was to evaluate in vitro biological behavior as viability, cell proliferation, adhesion and potential of stem cell differentiation of human dental pulp grown on scaffold samples composed of a new blend of poly ϵ -caprolactone/poly(rotaxano). Dental pulp stem cells obtained from human molars (hDPSCs) were grown from frozen samples and re-characterized. Cells were seeded onto scaffolds samples or glass coverslips and cultured in different media: clonogenic, mineralizing and conditioned by the biomaterial extract per 1,3,7,14 and 21 days. Cells growth curves and viability, alkaline phosphatase activity, formation of mineralized nodules were assessed. Cell adhesion was observed by scanning electron microscopy up to 7 days cultures. Scaffolds were flat, flexible and proved to be amphiphilic with physical characteristics of randomly arranged fibers and pores interconnected with an average diameter of 13,5 μ m and aperture average area of 87,14 μ m². The hDPSCs expressed typical levels of mesenchymal stem cell surface markers. There was no inhibition of cell growth at the biomaterial interface. The growth rates and viability were more significant ($p < 0.01$), especially in 7 days, to cultures over scaffolds in clonogenic medium. Similar results were observed with the mineralizing medium ($p < 0.05$). There formation of mineralized nodules was increased in the cultures in the presence of scaffolds, in other words, the biomaterial stimulated cell differentiation. In scanning electron microscopy the cells were shown to be attached until 7-day period with formation of

sheets over the scaffolds. The blend of poly ϵ -caprolactone/poly(rotaxano) shows biocompatibility in vitro, revealing promising aspects to be functionalized by stem cells derived from human dental pulp with potential to be used as bioactive biomaterials for bone tissue bioengineering.

Keywords: Dental pulp. Stem cell. Polymeric biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Micrografia eletrônica de varredura apresentando a morfologia das fibras de PCL/poli (rotaxano) eletrofiadas em 5 ml/h	44
Figura 4.2 - Conformação da membrana para a utilização como scaffold	46
Figura 4.3 - Esquema de adaptação das membranas e lamínulas de vidro nos poços para cultivo celular	50
Figura 4.4 - Microscópio Eletrônico da Varredura -Departamento de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica da USP	55
Figura 5.1 - Porcentagem de absorção de água aferida de 24 horas a 21dias.....	57
Figura 5.2 - Foto micrografia em microscopia de fase aumento original 40X. Cultura subconfluente em primeira passagem (P1) exibindo células estreladas, espraiadas e em divisão celular (ponta de seta).....	58
Figura 5.3 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs positivos para CD44, CD146, STRO-1 e os de indiferenciação (Nanog). Os gráficos do lado esquerdo indicam porcentagem (%) de células positivas ao anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os gráficos do lado direito mostram negatividade para os controles isotípicos de cada marcador. Os picos cinza-escuro representam a população celular marcada com o anticorpo.	59
Figura 5.4 - Ilustração gráfica da imunofetotipagem da hDPSCs após os descongelamento na segunda passagem (P2) mostrando expressão mínima ou não expressão para as células hematopoiéticas (cd45) e endoteliais (CD14) e CD34.	60

Figura 5.5 - Foto micrografias exibindo hDPSCs em meio clonogênico e em meio condicionado. Em A, D e G grupo controle negativo em 24 horas, 3 e 7 dias, respectivamente, após o plaqueamento. Células em divisão celular (ponta de seta isolada). Em B, E e H células em cultivo no grupo teste 1 nos mesmos períodos. Interface (pontas de seta múltiplas) do scaffold (estrela) com a camada celular exibindo continuidade. Em C, F e I células em cultivo em meio clonogênico condicionado pelo extrato da blenda de PCL/Polirotax. Em 7 dias todos grupos apresentaram confluência em todos o fundo da placa (em aumento original 40X) 61

Figura 5.6 - Curva de crescimento das hDPSC nos grupos controle negativo, teste 1 e condicionado (extrato da membrana) 62

Figura 5.7 - Foto micrografias exibindo hDPSCs em meio mineralizante. Em A, C E e G grupo teste 2 em 24 horas, 3, 7 e 21 dias, respectivamente, após o plaqueamento. Células em divisão celular (ponta de seta isolada). Interface (pontas de seta múltiplas) do scaffold (estrela) da blenda de PCL/Polirotax e a camada celular exibindo continuidade. Em B, D F e H células em cultivo no grupo controle positivo nos mesmos períodos (aumento original) 64

Figura 5.8 - Curva de crescimento celular das hDPSC em meio mineralizante. - * diferença estatisticamente significativa quando $p < 0.01$, § significativo quando $p < 0.05$. ns sem diferença significativa. Anova-1 médias e desvios-padrão.....65

Figura 5.9 - Resultado do ensaio de Atividade de fosfatase alcalina 66

Figura 5.10 - Poços de cultivo de hDPSCs após 21 dias. Em **A** cultura em meio clonogênico após a reação pelo vermelho de alizarina em **B** scaffold com cultura celular em meio clonogênico (teste1) exibindo marcas avermelhadas na superfície. Em **C** cultivo em meio mineralizante ponta de seta evidencia formação de nódulo de minrelaização (controle positivo) e em **D** cultivo na presença do scaffold (Teste 2) com intensa coloração vermelha do meio após reação. Em **E** e **F** Fotomicrografia das células cultivadas em meio mineralizante no controle positivo e no teste 2 respectivamente (pontas de seta) evidenciando nódulos de mineraliação (aumento original 40X) 68

Figura 5.11 - Poços de cultivo de hDPSCs em 21 dias após a remoção da solução da reação do ensaio de Vermelho de alizarina. Em **A** scaffold com cultura celular em meio clonogênico exibindo marcas avermelhadas na superfície (pontas de seta) **B**. laminula de vidro (controle negativo) em meio clonogênico após a reação pelo vermelho de alizarina. Em **C** scaffold (Teste 2) com intensa coloração vermelha (ponta de seta) formação de nódulo de mineralização (controle positivo) e em **D** lamínula de vidro (controle positivo) e nódulos de mineralização (pontas de seta). Abaixo o gráfico de colunas ilustra as médias e desvio-padrão e as diferenças estatísticas evidenciando as diferenças de densidade óptica da reação do Vermelho de alizarina indicando mineralização nas culturas dos grupos teste 2 e controle positivo. * significativo $p < 0.05$ – Anova 1.....69

Figura 5.12 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura dos scaffolds com a adesão celular em forma de células isoladas e agrupadas nos primeiros períodos 24h e 3 dias e em lençóis de monocamadas em 7 dias (aumento original) 600x.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Análise de Variância</i>
ASC	Células tronco de origem adiposa
BMSC	Células tronco de medula óssea
CDs	Ciclodextrinas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ePTFE	Politetrafluoretileno expandido
FDA	Do inglês: Food and Drug Administration
hDPSC	Célula tronco de polpa dentária humana
hMSC	Célula tronco mesenquimal humana
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Teste de atividade mitocondrial
nPTFE	Politetrafluoretileno não expandido
PBS	solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio
PCL	poli ϵ -caprolactona
PDLLA	poli(D,L-lactido
PFA	Paraformaldeído
PGA	Poligalactina
PHBV	poli (b-hidroxibutirato-co-b-hidroxivalerato)
pHMGCL	poli(hidroximetilglicólico-co-e-caprolactona)
PLA	Ácido poli Láctico
PLGA	poli(lactico-co-glicólico)
PLLA	poli(L-lactido)
ROG	Regeneração óssea guiada
TCP	Beta tricalcio fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

g/mol	Gramma por mol
mg	Miligramma
mg KOH/g	Miligramma de hidróxido de potássio por grama
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
Kv	Quilovolt
mL/h	Mililitro por hora
µl	Microlitro
%	Por cento
M _{seca}	Massa seca
M _{úmida}	Massa úmida
K Gy	kilogray
U/mL	Unidades por mililitro
mM	Milimolar
g	Gramma
cm ²	Centímetros quadrado
pH	Potencial hidrogeniônico
xg	Força centrífuga
nm	Nanômetro
mg/mL	Miligramma por mililitro
M	Molar
µm	Micromêtro
<	Menor
p	Nível descritivo ou probabilidade de significância
µm ²	Micrômetro ao quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Bioengenharia.....	29
2.2	Tipos celulares	29
2.2.1	Células tronco.....	30
2.3	Biomateriais para regeneração guiada e scaffolds	31
2.3.1	Não absorvíveis.....	31
2.3.2	Scaffolds naturais.....	32
2.3.3	Scaffolds sintéticos.....	34
2.3.4	Características microestruturais dos scaffolds	38
2.3.4.1	<i>Porosidade</i>	<i>38</i>
2.3.5	A biofuncionalização de scaffolds por meio de células.....	39
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Obtenção e caracterização da membrana	43
4.1.1	Diâmetro das fibras e dos poros.....	44
4.1.2	Ângulo de contato.....	44
4.1.3	Ensaio de absorção de água.....	45
4.1.4	Preparo do scaffold	45
4.2	Linhagem celular	46
4.3	Cultivo celular	46
4.3.1	Recaracterização das células.....	48
4.3.1.1	<i>Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo</i>	<i>48</i>
4.4	Grupos experimentais.....	49
4.4.1	Meio mineralizante	50
4.4.2	Meio condicionado pela presença da membrana	51
4.4.3	Viabilidade e curva de crescimento celular	52
4.5	Quantificação da atividade de fosfatase alcalina	52
4.6	Formação de nódulos de mineralização	53
4.7	Avaliação da adesão e morfologia celular	54

4.8	Análise estatística.....	55
5	RESULTADOS	57
5.1	Caracterização morfológica e microestrutural da blenda polimérica ...	57
5.1.1	Ensaio de absorção de água	57
5.2	Recaracterização das células tronco	58
5.2.1	Morfologia celular.....	58
5.2.2	Identificação dos imunomarcadores de células tronco	59
5.3	Viabilidade e curva de crescimento celular	61
5.4	Diferenciação celular	63
5.4.1	Quantificação da atividade de fosfatase alcalina	66
5.4.2	Formação de nódulos de mineralização	67
5.5	Avaliação da adesão e morfologia celular	70
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos podem ser consequência de variados traumatismos, de doença periodontal que leva a perda dentária, de deformidades congênicas ou da perda óssea após a terapêutica cirúrgica de ressecção em diversas doenças dos maxilares. A extensão destes defeitos pode muitas vezes se tornar crítica e dificultar a reabilitação morfofuncional do paciente, principalmente quando se planeja a colocação de implantes dentários. A utilização de enxerto autógeno tem sido o padrão de referência para as reconstruções de rebordo alveolar, tanto em altura quanto espessura para a posterior reabilitação protética do paciente. Pode ser obtido de áreas doadoras intra ou extra bucais, sendo que a primeira representa menor desconforto ao paciente e menor risco de complicações. O osso autógeno apresenta propriedades de osteocondução, osteogênese e, osteoindução pela capacidade de neoformação óssea das células mesenquimais inerentes ao enxerto (1-5).

Entretanto, a utilização de enxertos autógenos apresenta algumas desvantagens como a reabsorção imprevisível em longo prazo, a limitação quanto à quantidade de material possível de ser obtido, a necessidade de cirurgia adicional no leito doador, risco de complicações pós-operatórias principalmente relacionadas à região do leito doador (6-8). A busca, portanto, por um material de enxertia que elimine as desvantagens do osso autógeno tem levado à pesquisa de um substituto que proporcione menores riscos e danos ao paciente (9-11). Vários tipos de substitutos têm sido estudados com essa finalidade, dentre eles, o enxerto homogêneo, o heterogêneo e o aloplástico. Esses biomateriais têm sido reportados como alternativas viáveis, com índices de sucesso variáveis (7, 12).

Além dos materiais de enxertia, técnicas como a regeneração óssea guiada (ROG) também conquistaram seu espaço desde a década de 80 juntamente com a popularização dos implantes osseointegrados e com o desenvolvimento da engenharia tecidual, visando a regeneração de tecidos pelo emprego dos mais variados biomateriais (13).

Ao longo dos anos, cada vez mais a engenharia caminha próxima à área da saúde para buscar novas soluções frente aos problemas que o cirurgião e paciente enfrentam na prática clínica da reabilitação morfofuncional. Atualmente, a

bioengenharia tem procurado buscar novos biomateriais que possam ser funcionalizados por células para melhorar os resultados na regeneração, restauração ou melhora da função de tecidos danificados.

As células tronco apresentam as melhores características biológicas para a regeneração dos tecidos. São células indiferenciadas, com características particulares de diferenciação em diversos tipos tecidos. Está claro na literatura que o caminho da diferenciação é dependente do estímulo aplicado e das condições favoráveis no microambiente de cultivo, além do potencial de auto renovação, ou seja, a proliferação celular (14, 15). Muitas são as origens das células tronco para funcionalização de biomateriais podendo ser provenientes da medula óssea, de tecidos constituintes e estruturas dentais. Aquelas que provêm de tecidos dentários são obtidas de forma relativamente simples e tem mostrado um alto potencial de diferenciação.

Quanto aos biomateriais, existe uma grande variabilidade de composições e de estruturas físico-químicas com o propósito de funcionalização. Os polímeros sintéticos, uma das classes de biomateriais mais estudadas, têm sido objeto crescente de pesquisas especialmente quanto às suas propriedades biológicas. Dentre eles as blendas poliméricas nano particuladas de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) foram desenvolvidas como um novo biomaterial para a confecção de scaffolds. Entretanto, o potencial biológico quanto ao seu comportamento frente à morfologia, proliferação, diferenciação de células tronco humanas ainda deve ser investigado como parte da caracterização de um futuro material bioativo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioengenharia

Três estratégias devem ser adotadas para a criação de um novo tecido utilizando-se a bioengenharia: **a presença das células** ou substituto celular, que serão manipulados para funções específicas, em particular as células tronco mesenquimais humana (hMSC), **os fatores de crescimento**, que darão o estímulo a essas células, e o **scaffold** (andaime ou arcabouço em tradução livre para o português) o suporte aloplástico ou orgânico que possa dar sustentação para a transferência de células na formação de um novo tecido (16).

2.2 Tipos celulares

A funcionalização dos scaffolds por meio de células é a chave para a engenharia tecidual com o propósito de regeneração de tecidos. Na regeneração de tecido ósseo a maioria dos materiais utilizados como scaffolds não possui propriedades osteoindutoras ou osteogênicas suficientes para que ocorra uma neoformação óssea satisfatória. Assim sendo, a semeadura de células mesenquimais sobre scaffolds com sua posterior diferenciação, é a melhor maneira de funcionalizar um scaffold e torna-lo bioativo. Para esse fim uma diversidade de tipos celulares podem ser utilizada, sendo a origem da célula uma das questões fundamentais para a engenharia de tecidos (17).

2.2.1 Células tronco

As células tronco podem ter diferentes origens. As células tronco de medula óssea (Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells - BMSCs) são certamente o tipo celular mais utilizado para funcionalização de scaffolds para estudos na área de regeneração tecidual. A medula óssea é uma fonte enriquecida deste tipo celular, que se obtém a partir de um aspirado de medula óssea com o potencial para se diferenciar em linhagens celulares distintas, tais como osteoblastos, condrócitos, células adiposas e nervosas. Também são relativamente simples de serem isoladas e expandidas *in vitro* (18-21).

As células tronco de origem adiposa (adipose stem cells - ASCs) são isoladas a partir de tecido subcutâneo adiposo humano descartados na lipoaspiração por exemplo. O interesse sobre essa fonte celular tem crescido continuamente e provavelmente venha a desempenhar futuramente um papel de destaque frente aos procedimentos de regeneração tecidual. A técnica de coleta celular é considerada simples, existe em quantidade abundante, o procedimento apresenta baixa morbidade. Este tipo celular tem alto potencial de diferenciação e rápida expansão celular, além disso, as culturas de células adiposas podem ser expandidas muitas vezes sem perder as características de célula tronco (22-24).

As células tronco de polpa dentária (DPSCs) podem derivar da polpa dentária de molares de adultos, da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados e da papila apical. Além disso, células tronco de origem de tecidos da boca podem advir do folículo dentário, do ligamento periodontal da gengiva e ainda de tecido ósseo e mole removido durante a instalação de implantes dentários (25).

A célula tronco derivada de polpa dentária (Dental pulp stem cells - DPSCs), que tem origem do complexo dentina/polpa representa uma fonte bastante acessível e que pode ser isolada facilmente, apresentando características semelhantes às das células tronco originárias de medula óssea (BMSCs). Vários tipos de células tronco foram descritos como de origem dentária e de estruturas adjacentes, portanto, nem toda célula tronco de origem dentária irá apresentar as mesmas características fenotípicas e funcionais (26).

Uma característica muito relevante das DPSCs é a sua capacidade de poder regenerar o complexo dentina-polpa que é composto de matriz mineralizada, túbulos

com odontoblastos e tecido fibroso contendo vasos sanguíneos como encontrado em dentes humanos (27).

As DPSCs mostraram ser capazes de expressar marcadores ósseos e de formar unidades de colônia, apresentando baixa incompatibilidade imunológica, com maior taxa de proliferação e de sobrevivência. Esse tipo celular também mostrou ser hábil em se diferenciar em osteoblastos e produzir matriz extracelular bem como estrutura óssea trabecular (17, 28).

Apesar de apresentar diferenciação restrita quando comparado à BMSC, em estudo recente as DPSCs foram avaliadas quanto à capacidade de se diferenciarem em células neurais. A capacidade de diferenciação neural foi constatada após combinação com scaffold de quitosana, um polímero natural. Por conseguinte, as DPSCs também são consideradas uma fonte alternativa para terapia e futuras aplicações clínicas em lesão medular (25, 29).

2.3 Biomateriais para regeneração guiada e scaffolds

A escolha do scaffold adequado deve considerar várias características entre elas a sua adaptação ao leito receptor, necessidade ou não de resistência mecânica e a resposta biológica celular. A literatura classifica os scaffolds: como não absorvíveis e absorvíveis, sendo que os absorvíveis podem ser naturais, sintéticos ou híbridos (30, 31).

2.3.1 Não Absorvíveis

O material não absorvível tem sido utilizado preferivelmente com o propósito de promover a regeneração óssea guiada (ROG) e não como scaffolds para cultura celular. O princípio fundamental da ROG (32), nos defeitos ósseos periodontais por exemplo, é que por meio do emprego de barreiras mecânicas, normalmente no formato de membranas ou filmes, que restringem a entrada de epitélio gengival

e/ou de tecido conjuntivo fibroso permitindo apenas a entrada de células pluripotentes do ligamento periodontal e do osso favorecendo a formação de tecido ósseo (33, 34). A promoção da ROG também ocorre quando se utiliza a técnica para a manutenção de material de enxertia em contato com tecido ósseo remanescente nos defeitos, principalmente nos casos de enxertos particulados.

Como material não absorvível podemos citar a membrana composta de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) material reconhecido por ser inerte e biocompatível com os tecidos constituindo-se de matriz de nódulos e fibrilas, em uma microestrutura de porosidade diversa (35). Apesar de apresentar resultados satisfatórios, observou-se que a membrana ePTFE quando exposta na cavidade bucal apresenta risco aumentado de infecção devido sua alta porosidade, o que pode prejudicar o resultado final do tratamento. Como alternativa, foi criada a membrana PTFE densa não expandida (nPTFE), que quando comparada a membrana expandida tanto em estudos *in vitro* quanto estudos clínicos mostrou-se funcionalmente melhor como barreira a entrada de células indesejáveis (36-38).

Scaffold com material não absorvível recentemente foi utilizado com propósito diferente da ROG, nanopartículas de prata foram utilizadas juntamente com polímeros para a camada externa removível de um scaffolds para o cultivo de células tronco de origem adiposa. As nanopartículas de prata foram adotadas devido suas propriedades antibacteriana e anti-inflamatória (39).

2.3.2 Scaffolds naturais

Considerando a ROG, a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para remoção desses materiais, levou ao desenvolvimento de membranas absorvíveis que apresentassem a mesma resistência mecânica do material não absorvível, com tempo de absorção suficiente para promover neoformação óssea. A membrana de colágeno foi uma das primeiras a ser utilizada. Ela é composta por um polímero natural que tem a propriedade de se degradar sem necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção e é biocompatível (35). Essa membrana mostrou ótimos resultados clínicos sobre enxertos autógenos em bloco e particulados para

posterior reabilitação por meio de implantes, promovendo maior porcentagem de formação óssea quando comparado à não utilização da mesma tanto em altura quanto espessura (40, 41). Entretanto, elas possuem pouca resistência mecânica, dificuldade de manuseio e são potencialmente antigênicas (35). Apesar disso, as membranas absorvíveis têm apresentado ótimos resultados, mostrando melhor compatibilidade ao tecido mole quando comparado às membranas não absorvíveis, criando um microambiente adequado para a neoformação óssea (42-44).

Quando falamos da utilização de polímeros naturais, não como barreira mecânica, mas como scaffolds para cultivo celular, podemos destacar a quitosana, o alginato e a fibrina além do colágeno, e da gelatina (45, 46).

A quitosana, derivada da desacetilação da quitina é um polímero policatiônico que atua como análogo de polissacarídeos presentes in vivo, sendo estruturalmente semelhante às glicosaminoglicanas sulfatadas e ao ácido hialurônico, os quais são componentes de proteoglicanos presentes na cartilagem articular. Como propriedades podemos destacar a sua capacidade hemostática, seu potencial para cicatrização, sua habilidade de se funcionar como liberador de drogas, sua biocompatibilidade, sua disponibilidade, adesividade, bioestabilidade, além de ser atóxica e antibacteriana. A quitosana pode ser utilizada tanto na forma de hidrogel como em scaffolds sólidos, características essas, que são importantes para bioengenharia. No entanto, apresenta como desvantagem seu processamento, que deve ser à base de solventes, o que pode gerar propriedade mecânica pouco satisfatória (47), dificuldade no controle de sua morfologia e degradação relativamente lenta. A evidência de sua utilização in vivo é limitada e a melhora de sua propriedade mecânica pode se dar combinando a quitosana com outros materiais como alginato e gelatina por exemplo (24, 48-51).

O alginato (ácido algínico), é um polímero derivado de algas marinhas, polissacarídeo biodegradável frequentemente usado na engenharia tecidual como suporte para scaffolds híbridos como o de quitosana, TCP(Beta tricalcio fosfato), gelatina e também pode ser combinado com polímeros sintéticos, como poli-epsilon-caprolactone (PCL), Poligalactina (PGA) com o propósito principal de melhorar as propriedades mecânicas do material e controle de reticulação polimérica (ligações entre moléculas lineares para produzir polímeros tridimensionais). O alginato pode ser utilizado como scaffold tanto na forma de hidrogel como membranas. Como aplicações desse material, destaca-se a liberação de fármaco para seu uso como

curativo para ferimentos, porém quando comparado aos outros materiais é pouco utilizado de forma isolada para o cultivo celular (23, 51-55).

O polímero de fibrina pode ser amplamente utilizado na engenharia tecidual para a fabricação de scaffolds, principalmente como cola de fibrina. Em estudos recentes revelou-se benéfico para engenharia tecidual óssea em conjunto com a hMSCs, apresentando excelente adesividade, compatibilidade e capacidade de estimular a condrogênese. Porém apresenta degradação rápida in vivo e baixa resistência mecânica. As colas de fibrina são compostas principalmente de fibrinogênio e trombina, a trombina é responsável por converter a fibrina que é um biopolímero em monômeros de fibrina. A estrutura de fibrina funciona como uma matriz temporária durante a reparação do tecido (45). Geralmente está combinada com outros materiais, como a seda, a hidroxiapatita ou PGA que melhora a resistência mecânica do material (51).

Finalmente, o colágeno, que é uma das proteínas mais abundantes no corpo humano e a gelatina (colágeno hidrolisado) derivado do colágeno animal produzida por desnaturação térmica (51). Ambos são biodegradáveis, não tóxicos e biocompatíveis (35). A membrana de colágeno mostrou ótimos resultados em cirurgias reconstrutivas e para liberação de fármacos. A gelatina é frequentemente utilizada em compósitos de hidrogel para melhorar suas propriedades mecânicas. Colágeno e gelatina são considerados um dos melhores biomateriais naturais e quando utilizados em associação a outros materiais como a hidroxiapatita se tornam bons osteocondutores (56). Apesar disso, há relatos de que os principais problemas do colágeno são sua antigenicidade e sua dificuldade de processamento (57).

Os scaffolds naturais apresentam vantagens sobre os sintéticos devido a presença de sinais de reconhecimento celular, pois a maioria deles são componentes normais do tecido que será regenerado (50).

2.3.3 Scaffolds sintéticos

Os biomateriais sintéticos oferecem propriedades mecânicas mais satisfatórias e controláveis. Dentre os biomateriais sintéticos estão aqueles a base

de polímeros. Polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores (os monômeros). Os monômeros são moléculas de baixa massa molecular os quais, a partir das reações de polimerização, vêm a gerar a macromolécula polimérica. As unidades repetitivas, chamadas de mero, provem da estrutura do monômero. O número de unidades estruturais repetidas, ou seja, o número de meros que podem se verificar na estrutura de uma macromolécula, é chamado grau de polimerização (58).

Os biomateriais sintéticos apresentam fácil reprodutibilidade devido sua composição química pré-estabelecida (59). Estudos recentes mostram que membranas sintetizadas a base de polímeros, formadas a partir de nanofibras, fibras na escala de micrômetros e nanômetros, apresentam grandes áreas de superfície e podem ser obtidas por diferentes processos físico-químicos. Dentre eles o processo de eletrofiação que facilita a fabricação de scaffolds fibrosos de biomateriais (60).

A técnica de eletrofiação é a aplicação de um campo elétrico sobre uma solução polimérica que leva a geração de nanofibras que se depositam em um anteparo. Este processo forma um filme ou uma membrana fina com grande área de superfície e alta porosidade. A composição desta rede de fibras pode ser variável de acordo com objetivo que se deseja alcançar. Esse processo permite a fabricação de membranas de fibras com potencial para uma grande variedade de aplicações (13).

Para a utilização como scaffold uma infinidade de materiais poliméricos sintéticos pode ser utilizada, a seguir serão descritos os principais materiais sintéticos empregados para regeneração de tecido ósseo.

O PCL é um polímero sintético composto por poli ϵ caprolactona (61). É considerado um material bastante versátil e tem sido muito utilizado na engenharia tecidual, apesar de apresentar degradação lenta, tem boas propriedades mecânicas, ambiente físico-químico favorável para diversos tipos celulares, principalmente as hMSCs (31, 61). Esse material foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para a utilização em humanos (62), tem baixo custo, é estável, biocompatível, e atóxico (14, 22, 63). É um poliéster alifático biodegradável, cuja hidrólise conduz ao ácido capróico de baixa concentração, consequentemente esse material não tem a tendência a causar reações negativas no tecido circundante (16).

Em associação a outros materiais como, por exemplo, o polímero natural - quitosana o PCL mostrou-se uma boa alternativa pra cultivo de células tronco mesenquimais de ratos, com o propósito de regeneração óssea e aplicações na engenharia tecidual (49). Este material também foi utilizado na confecção de scaffolds para o cultivo de hMSC, por meio de um dispositivo que realiza uma impressão biocelular, no qual se é possível controlar tamanho dos poros e formato tridimensional. Independente da característica tridimensional do material, todos os formatos foram biocompatíveis para o cultivo celular (64).

Outro estudo comparou o PCL com poli(hydroximetilglicolico-co-ε-caprolactone) (pHMGCL), ambos scaffolds foram confeccionados por prototipagem (plotagem tridimensional). A aderência das células foi maior no pHMGCL, muito provavelmente devido a hidrofobicidade do PCL, não sendo possível que as células completassem todos os poros do scaffolds, portanto a atividade metabólica também foi maior no pHMGCL. Como também demonstrado em outros trabalhos a associação do PCL com outros componentes, pode diminuir sua hidrofobicidade (65), melhorando o microambiente para a fixação das células, aumentando a eficácia da semeadura celular inicial, caso contrário, o crescimento celular poderia ser mais lento, devido à difusão inadequada de meio de cultura no scaffold, não havendo interação do meio com a célula (63, 66).

Scaffolds à base de ácido poli-láctico (PLA) tem sido amplamente utilizado para regeneração óssea. É considerado biocompatível e uma base adequada para proliferação e diferenciação celular, porém não é considerado bioativo, devendo ser combinado a outro material se for desejada essa propriedade. Este material pode ter diferentes formulações como poli(L-lactido)(PLLA), poli(D,L-lactido)(PDLLA) e o compósito de PLA+PGA denominado de poli(lactido-co-glicolico) (PLGA) (51). O PLGA tem boas propriedades mecânicas, é biodegradável, de fácil processamento, porém, apresenta superfície hidrofóbica o que diminui adesão celular e consequentemente pobre interação com a matriz celular tornando necessária a associação a outro material que traga essa propriedade como a hidroxiapatita por exemplo (46, 61). Em estudos recentes, o PLA foi utilizado junto a um polímero natural, a quitosana e vidro bioativo como scaffolds para células tronco adiposas, o que ajudou na funcionalização dos scaffolds para engenharia tecidual de tecido cartilaginoso (48).

O PLLA também foi utilizado em conjunto com PCL por meio de eletrofiação, para formação de scaffold nanofibroso. Um estudo mostrou que diferentes proporções de PLLA/PCL foram utilizadas (3/1, 2/1 and 1/1) para cultivo de células tronco humana de origem adiposa. Os testes de proliferação, adesão, viabilidade e diferenciação mostraram que a proporção de 1/1 apresentou os melhores resultados, sendo biocompatível o suficiente para repor a matriz extracelular, com melhor porcentagem de adesão (22).

Em outro estudo um scaffold híbrido composto de microesferas de PHBV 9 poli (b-hidroxibutirato-co-b-hidroxivalerato) em matriz de PLGA foi sintetizado com o propósito de reparar defeitos ósseos. Os scaffolds poliméricos, preparados particularmente na forma de microesferas empregados para apoiar o crescimento de hMSC. mostraram que mesmo em diferentes proporções de PLGA/ PHBV, a adesão e viabilidade celular ocorreu (67).

O polímero rotaxano possui uma arquitetura supramolecular única, com uma molécula cíclica circundando uma molécula de eixo linear. Os polirotaxanos e polipseudorotaxanos são polímeros com múltiplas moléculas cíclicas que circundam uma cadeia de eixos (68).

As ciclodextrinas (CDs) são compostos cíclicos que podem ser utilizados na formação do rotaxano. As ciclodextrinas, também conhecida como cicloamilases ou ciclomaltoses, são uma série de oligossacarídeos cíclicos naturais compostos de 6, 7, 8 ou mais unidades de glicose ligadas por ligações que podem ser nomeadas como α , β , e γ CD, respectivamente. As CDs apresentam anéis macrocíclicos que funcionam como moléculas hospedeiras que têm sido investigadas como complexo de inclusão com propriedades físicas e biológicas melhoradas para transferência de fármacos e também apresentando a característica de apresentar uma estrutura controlável (69).

Assim, ao longo dos últimos anos a ciclodextrina (CD) constituída em polipseudorotaxanos e polirotaxanos tem recebido cada vez mais atenção devido à sua arquitetura supramolecular intrigante e suas bio-aplicações promissoras. Apresenta como vantagens ser altamente disponível, biodegradável e biocompatível. Além disso, já foi descrito o efeito ósseo anabólico a partir de seus derivados, característica essa de extrema importância para engenharia de biomateriais e que necessita ser mais explorada (68, 70).

Em vista disso, avaliando as propriedades da união de polímeros como o PCL e o Rotaxano, verificamos que a literatura apresenta possibilidade de diversas aplicações da área médica, como por exemplo, sua utilização em um sistema de liberação controlada de fármaco e na engenharia tecidual para o crescimento de tecido epidérmico, muscular, ósseo e cartilaginoso (71-75).

2.3.4 Características microestruturais dos scaffolds

2.3.4.1 Porosidade

Atualmente, as propriedades esperadas em um scaffold, não se limitam apenas a um material biocompatível que permita adesão e proliferação celular, mas também que apresentem características inerentes a esse material que facilitem e favoreçam esse processo. Como já visto anteriormente, existe uma enorme quantidade de tipos, com diferentes propriedades, o que nos leva a pensar sobre a dificuldade de estabelecer um scaffold ideal. O tamanho e a geometria dos poros do scaffold, assim como sua interconectividade desempenham papéis extremamente importantes, podendo influenciar na adesão, viabilidade, diferenciação, migração e formação de novo tecido. De acordo com a literatura, o tamanho dos poros nos scaffolds varia de 50 a 500µm em diâmetro e a porosidade relativa nos materiais varia de 64 a 94% (16, 24, 49, 67, 76).

O mecanismo em especial que promove ou bloqueia a ligação de células, proliferação e diferenciação de células nos scaffolds com diferentes tamanhos de poros e formato não é ainda totalmente compreendido. Discute-se que poros mais largos podem promover a adesão e a proliferação celular para o interior do scaffold de maneira que as interações célula/célula sejam reduzidas devido aos grandes espaços. Porosidades menores podem promover interações celulares que podem facilitar mais a diferenciação do que a migração (64).

Alguns autores chamam a atenção de que os métodos convencionais como uso de solventes e eletrofiação (77) na síntese dos scaffolds podem não ser

capazes de reproduzir de forma padronizada o tamanho, geometria e distribuição dos poros. Assim, outras técnicas têm sido desenvolvidas para esse aperfeiçoamento como a utilização de impressão por jatos de tinta, modelagem por deposição de material fundido, estereolitografia, sinterização a laser e plotagem tridimensional (64).

2.3.5 A biofuncionalização de scaffolds por meio de células

A sobrevivência de células tronco transplantadas *in vivo* sofre grande influência das tensões de oxigênio, assim o controle da difusão vascular para oxigenação de um scaffold pode influenciar a formação de tecido ao longo do enxerto/transplante *in vitro*. Para que haja manutenção da vida das células transportadas *in vivo*. A porosidade do scaffold tem particular importância neste aspecto, uma vez que aumenta a possibilidade do crescimento vascular para o interior dos scaffolds melhorando o fornecimento de nutrientes (52).

Células tronco estão sendo utilizadas com sucesso para a correção de defeitos ósseos críticos em vários modelos animais como camundongos, ratos, coelhos, suínos, cabras e ovelhas (18).

Um scaffold combinado de PLGA e nano-hidroxiapatita funcionalizado por células tronco foi utilizado para reparação articular de defeito osteocondral em ratos. As análises histológicas após 3 meses mostraram que o defeito foi preenchido por cartilagem tipo hialina com quantidade abundante de glicosaminoglicanos e deposição de colágeno tipo-II. Estes achados sugerem que apesar do reparo ter acontecido com deficiência na formação de colagénio do tipo-I o scaffold pode ser potencialmente utilizado para a reparação da cartilagem em aplicações clínicas (46).

Scaffolds produzidos com diferentes concentrações de fibras de seda com o propósito de conseguir diversas conformações de poros foram funcionalizados por células tronco de medula óssea com e sem proteínas ósseas morfogenéticas e transferidos para defeitos ósseos em calvária de ratos. A análise histológica dos espécimes mostrou que não houve reação inflamatória após 4 semanas de implantação e maior neoformação óssea próximo a borda do defeito e no interior dos scaffolds quando estes estavam associados a proteína morfogenética (19).

Scaffolds produzidos a partir de cloreto de polivinilideno funcionalizados por células tronco da medula óssea foram utilizados em um estudo para verificar o potencial do scaffold funcionalizado por células para promoção de osteogênese em defeito ósseo de calvária. Os resultados mostraram que após 6 semanas da implantação dos scaffolds houve neoformação óssea apenas naqueles que continham as células diferentemente dos controles sem cultivo celular (78).

Em 2015, um estudo investigou a influencia da microarquitetura do scaffold de criogel de poli (etileno glicol) diacrilate-co-N-acrilico- 6-aminocaproic ácido na diferenciação osteogênica de células tronco humana. Para tal, o scaffold após cultivo e diferenciação osteogênica celular foi inserido na região subcutânea de ratos para verificar a formação de tecido ósseo ectópico. Após 24 horas, 2, 4, 6 e 9 semanas da implantação o scaffold com as células diferenciadas mostrou formação de tecido ósseo periférico, confirmado por meio de micro tomografia após nove semanas. A análise histológica e imuno histoquímica comprovou a neoformação óssea in vivo diferente do que aconteceu com o grupo controle onde as células não sofreram diferenciação (79).

Recentemente, estudos em humanos têm surgido na literatura, demonstrando os benefícios das terapias com células tronco para regeneração óssea e reparação tecidual (80, 81). Ensaio clínico randomizados preliminares tem mostrado que utilização células tronco autógena para correção de defeitos ósseos periodontais pode ser segura e não apresentar efeitos colaterais (82). Além de relatos clínicos do emprego de células tronco para reconstrução oral e maxilofacial e na reabilitação com implantes dentários alguns ensaios clínicos envolvendo áreas de aumento de rebordo ósseo tem surgido (83, 84) para aumentar o volume ósseo em regiões que serão reabilitadas por meio de implantes. Entretanto, os estudos ainda são raros, pouco padronizados e com resultados ainda insuficientes (85, 86).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o comportamento biológico quanto à citotoxicidade da membrana de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) e seu potencial funcional de diferenciação no cultivo de células-tronco derivadas de polpa dentária humana (hDPSC).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da FOUSP (CEP-FOUSP), em 03 de fevereiro de 2016, com o número de parecer: 1.402.217 (ANEXO A).

4.1 Obtenção e Caracterização da Membrana

A blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) foi eletrofiada na Faculdade de Engenharia Mecânica no Departamento de Materiais da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Os materiais utilizados nesse material foram o poli ϵ -caprolactona (PCL), um polímero da classe dos poliésteres alifáticos com massa molar de 80,000 g/mol (Sigma Aldrich) e o poli (rotaxano) obtido a partir de macromoléculas de ciclodextrinas fornecidas por UBE Industries Ltd (Nº A1000), com peso molecular de 496000 g/mol e índice de hidroxila de 71 mg KOH/g. Os ativadores e catalisadores utilizados foram o clorofórmio (Merck-Alemanha) e acetona (Synth-Brasil) misturados em diferentes proporções de peso sem nenhum tratamento ou purificação. A solução de polímeros e catalisadores foi agitada por duas horas. (New Ethics Shaker, Modelo 114) à 23° C. Uma seringa plástica descartável de 10 mL com agulhas de 0,7 mm de diâmetro, uma bomba de infusão (kdScientific, Modelo KDS-100), uma fonte de tensão de 15 e 20 kV (Testtech) e uma placa coletora aterrada foram utilizadas para a eletrofiação no mesmo dia do preparo da mistura de clorofórmio, acetona e adição de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) em uma vazão de 5mL/h. A imagem em microscopia eletrônica de varredura (MEV) da membrana da blenda está representada pela figura 4.1.

Figura 4.1 - Micrografia eletrônica de varredura apresentando a morfologia das fibras de PCL/poli (rotaxano) eletrofiadas em 5 ml/h.

4.1.1 Diâmetro das fibras e dos poros

O diâmetro médio das fibras e poros foi determinado pela imagem em microscopia eletrônica de varredura aleatoriamente em 50 fibras e 10 campos de três membranas das blendas utilizando-se o programa computacional ImageJ (NHI, Bethesda, USA).

4.1.2 Ângulo de contato

Para avaliar o caráter hidrofílico da membrana de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) foi medido o ângulo de contato de gotas de água sobre a superfície da blenda. Para isso, gotas de água deionizada com 5 μ L foram dispensadas com uma pipeta (Transferpette) sobre a superfície de uma amostra da membrana em

temperatura ambiente de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ em humidade relativa de $40\pm 4\%$. As imagens de três gotas aleatórias foram observadas utilizando um microscópio de luz (Hitachi com Axio s40 V4.8) e suas imagens foram capturadas e analisadas pelo programa ImageJ (NHI, Bethesda, USA) complementado pelo Drop Shape analysis-LB-ADSA.

4.1.3 Ensaio de Absorção de água

O ganho percentual de massa quando uma amostra do scaffold era imerso em água foi testado para a percentagem de absorção de água de 3 amostras do scaffold. Foi determinado o peso da amostra seca (M_{seca}) e em seguida as amostras foram imersas em água deionizada por 24 horas, 3, 7, 14 e 21 dias. Em cada período as amostras eram suspensas e o excesso de líquido era absorvido por um papel de filtro. As amostras úmidas eram pesadas ($M_{úmida}$). Após a pesagem as amostras voltavam para imersão. O percentual de porosidade foi representado pelo cálculo na seguinte equação: $AA (\%) = \frac{M_{úmida} - M_{seca}}{M_{seca}} * 100$.

4.1.4 Preparo do Scaffold

As membranas foram conformadas em scaffolds, como mostrado na figura 4.2. recortadas em discos com diâmetro de 13mm de forma padronizada, embaladas individualmente, esterilizadas por meio de Irradiação Gama (8-10k Gy) no Instituto de Pesquisas em Energia Nuclear (IPEN – São Paulo, Brasil) e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz até a sua utilização nos experimentos.

Figura 4.2 - Conformação da membrana para a utilização como scaffold.

4.2 Linhagem Celular

Para esse experimento, foram utilizadas um *pool* (agrupamento) de células tronco de polpa dentária humana obtidas a partir de terceiros molares extraídos de pacientes entre 15 e 27 anos, por indicação ortodôntica, na clínica da disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). As células foram previamente isoladas e caracterizadas como células tronco de polpa dentária humana (hDPSCs - do inglês *dental pulp stem cells*) (87).

Alíquotas congeladas destas células foram mantidas no banco de células do laboratório de Pesquisas Básicas “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

4.3 Cultivo Celular

Um tubo criogênico com a linhagem celular crioprotegida em dimetilsulfóxido, armazenado em nitrogênio líquido (DMSO – Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi descongelado em banho-maria a 37°C (Fanem, SP, Brasil) por 2 minutos. Para

remover o DMSO, as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo meio clonogênico composto por: 10 ml de alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) (Gibco® - Life Technologies) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Mesenchymal Stem Cell, Qualified, Specialty - Gibco® - Life Technologies) e 1% de 10000 U/ml de penicilina + 10000 μ g/ml de estreptomicina (Pen Strep- Gibco® - Life Technologies), 1% de L-Glutamina (L-Glutamine 200mM/100x- Gibco® - Life Technologies) e 1 % de solução 0.1 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente (Centrífuga Excelsa Baby I modelo 206 - Fanem, SP, Brasil). Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células, resultante da centrifugação, foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura fresco. A suspensão das células transferida para um frasco de 25 cm², contendo 4 ml de meio de cultura clonogênico fresco, que foi mantido em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar.

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar (VECO– Campinas, SP, Brasil), seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura (normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8). A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultura trocado a cada 2 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após ocuparem subconfluência de cerca de 70 a 80% da área cultivável do frasco as células foram subcultivadas.

O meio do frasco de cultivo foi aspirado e as células lavadas com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA, do inglês *calcium and magnesium-free phosphate buffered saline*) em pH 7,2. A seguir, as células foram destacadas com 2ml de uma solução de tripsina à 0,25% (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) em estufa à 37 °C por 3-5 min. A tripsina foi inativada por meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas (300Xg) durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1 ml de meio clonogênico fresco. Essa suspensão de células foi então colocada em novos frascos de cultivo, criando novas passagens da cultura. As células utilizadas nos experimentos foram expandidas no máximo até a 6ª passagem.

4.3.1 Recaracterização das células

Para verificar se as células após o descongelamento ainda mantinham as características de células-tronco mesenquimais as células foram submetidas à citometria de fluxo em equipamento multiusuário no Laboratório de Imunologia Experimental do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

4.3.1.1 Caracterização imunofenotípica por citometria do fluxo

Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente a progenia das populações celulares de polpa dentária foi utilizado um painel de anticorpos primários, conjugados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou alofococianina (APC), contra moléculas de superfície humanas, a saber: CD14-PE, CD44-APC, CD45-APC (BD Biosciences, CA, EUA), CD146-APC (Biolegend, CA, EUA), STRO-1-FITC (BD Biosciences) e, ainda, os anticorpos não acoplados de fábrica Nanog, bem como seu controle isotípico IgG2k-FITC (BD Biosciences) e CD34-FITC (Dako).

As culturas foram subcultivadas até a obtenção de no mínimo 1×10^6 células por marcador de superfície. Todo protocolo de citometria foi realizado a 4°C e as centrifugações realizadas a 550xg por 5 minutos. As placas de cultivos foram acondicionadas em recipiente gelado e então as células foram lavadas duas vezes em PBSA e colhidas com solução de enzima marinha com atividade colagenolítica e proteolítica (*StemPro Accutase*; GIBCO) por 10 minutos, sob agitação, para minimizar a internalização de antígenos de superfície. As células foram então centrifugadas e fixadas em 10 ml de solução de paraformaldeído (PFA) a 4 % e uma alíquota de 10 µl foi coletada para contagem do número de células em câmara de Neubauer. Esse conteúdo foi armazenado a 4 °C até o dia da leitura das amostras no citômetro de fluxo, não ultrapassando o período de 7 dias.

No dia da análise as células foram lavadas duas vezes em PBSA a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e solução de albumina de soro bovino (BSA; do inglês,

bovine serum albumine) à 5 % foi adicionada às células por 1 hora para bloqueio de sítios inespecíficos. As células foram ressuspensas em PBSA (3% BSA) e marcadas com anticorpos primários (200:1) com tempo de incubação de 1 hora. Além desse passo, os anticorpos que não vinham de fábrica conjugados ao fluorocromo (Nanog) foram incubados por mais 1 hora com fluoróforos próprios. (controle isotópico IgG2k-FITC).

A suspensão de células foi então lavada três vezes em PBSA. A seguir, a suspensão de células marcadas foi filtrada (70µm) e colocada em tubos para ser contada e classificada em leitura no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences. Foram adquiridos 50.000 eventos dentro do *gate*. Os dados foram analisados pelo programa 9.6.2 FlowJo Software Version (*Tree Star*, OR, EUA).

4.4 Grupos experimentais

Para as análises de citotoxicidade, diferenciação celular e do potencial de funcionalização da membrana o experimento foi dividido em 5 grupos. O cultivo celular se estendeu por um período de 24h até 21 dias dependendo do grupo experimental e do ensaio de análise representados na Tabela 4.1.

As células foram semeadas em placa de 12 poços na quantidade de 1×10^3 células por poço, contendo ou não o scaffold em meio de cultivo conforme o grupo experimental. Com o auxílio de uma pinça Dietrich (Quinelato[®]) estéril, os scaffolds ou lamínulas de vidro (Knittel[®]) foram acomodados individualmente nos poços. Depois de adaptados, as células foram semeadas juntamente com 250µL de meio de cultura, conforme o grupo, cuidadosamente sobre o scaffolds ou lamínulas, a placa foi deixada por 1 hora na estufa em temperatura de 37°C em seguida cada poço foi preenchido com 750µL de meio de cultura, ficando assim cada poço com 1 mL de meio de cultivo (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Esquema de adaptação das membranas e lamínulas de vidro nos poços para cultivo celular

4.4.1 Meio mineralizante

A indução do processo de diferenciação foi realizada por meio de cultivo mineralizante (ou osteogênico) contendo α MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) e por 10mM β -glicerofosfato de Na (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA), 50 μ g/ml ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) e 10⁻³M de dexametasona (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). O início da diferenciação celular foi realizado a partir do momento em que se observava subconfluência das células nos poços.

Tabela 4.1 Grupos experimentais com discriminação dos meios de cultura

Grupo controle positivo	Células cultivadas sobre lamínulas de vidro em meio mineralizante
Grupo controle negativo	Células cultivadas sobre lamínulas de vidro em meio clonogênico
Grupo controle condicionado	Células cultivadas sobre lamínulas de vidro em meio condicionado pela presença do scaffold 7,5mg/mL por 24 horas.
Grupo Teste 1	Células cultivadas sobre scaffold em meio clonogênico
Grupo Teste 2	Células cultivadas sobre scaffold em meio mineralizante.

Foram realizadas 6 réplicas para cada grupo experimental a ser testado. As células foram mantidas em cultivo em todos os grupos por 24 horas até 21 dias para o teste de viabilidade nos grupos controles e testes.

4.4.2 Meio condicionado pela presença da membrana PCL/polirotax

A fim de verificarmos se a membrana pode liberar algum tipo de substância que possa interferir com o crescimento e/ou com a diferenciação celular foi utilizado meio de cultivo condicionado. Este meio foi preparado pela imersão do scaffold de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) na concentração de 7,5mg por ml de meio de clonogênico.

A amostra do scaffold foi mantida em meio de cultura por 24 horas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi armazenado para ser utilizado como meio condicionado pela membrana.

4.4.3 Viabilidade e curva de crescimento celular

Após os períodos experimentais de 24 horas, 3, 7, 14 e 21 dias foi realizado teste de atividade mitocondrial (MTT) em todos os grupos. Os scaffolds (grupos teste) e as lamínulas de vidro (grupos controle) foram cuidadosamente removidos por meio de pinça de Dietrich (Quinelato[®]) estéril e transferidos para uma placa vazia de 12 poços (sem células), para garantir a contagem exclusivamente das células aderidas sobre a membrana ou sobre lamínula). Para a realização do ensaio de MTT, estas placas receberam 240 µl de meio de cultivo fresco e 60 µl de solução 12mM MTT (reagente A- Life Technologies[®]). Após um período de incubação de 4 horas, o reagente A foi removido e adicionado 600 µl de (CH₃)₂SO DMSO-Dimetilsulfóxido, P.A.-A.C.S (reagente B), homogeneizando cada poço com o auxílio de uma pipeta para realização de mistura entre os componentes. Após 15 minutos os scaffolds e lamínulas foram removidos e a placa foi colocada em espectrofotômetro para leitura da absorbância, com filtro de 562 nm.

Todos os experimentos foram realizados em 6 réplicas. Para análise da proliferação celular foi observado o crescimento celular, nos 5 períodos relatados anteriormente. A viabilidade celular também foi analisada, que indiretamente forneceu o número de células viáveis no decorrer do tempo experimental até 21 dias. Os dados do teste de redução do MTT foram utilizados para a construção de curvas de crescimento celular. Os dados de densidade óptica (DO) foram utilizados para a construção de curvas de crescimento para cada grupo experimental.

O cultivo celular de todos os grupos foi acompanhado em microscópio de luz invertido a cada 48 horas quando o meio de cultivo foi trocado.

4.5 Quantificação da atividade de Fosfatase Alcalina

Os efeitos da diferenciação foram avaliados pela atividade de fosfatase alcalina foi realizada nos grupos teste e controle, com exceção do grupo controle condicionado. O período analisado foi de 14 dias, seguindo protocolo do Kit de

Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 590 nm.

4.6 Formação de nódulos de mineralização

Culturas confluentes com 21 dias, foram submetidas ao ensaio de Vermelho de Alizarina (ARS), para detecção de possíveis nódulos mineralizados. O Vermelho de Alizarina cora áreas ricas em cálcio e é usado para visualizar precipitações de cálcio nas células.

As amostras foram lavadas com PBS gelado (pH 7,2; LGC Biotecnologia) por 2 vezes, as células aderidas foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram lavadas com água destilada por 2 vezes. Em seguida, as amostras foram coradas com 200µl de solução de Vermelho de Alizarina (Alizarin red S -ARS da Sigma Aldrich) a 1%, pH 4,2 por 30 minutos sobre agitação em temperatura ambiente e depois lavados com água destilada para remoção de excesso de corante não ligado. O precipitado de cálcio presente foi corado em vermelho, revelando nódulos de mineralização, que foram examinados por meio de uma análise qualitativa e quantitativa.

Na análise qualitativa foram feitas capturas de imagens por uma câmera digital para identificação da intensidade de vermelho da reação final do corante em cada grupo, nas membranas do grupo teste 1 e teste 2 comparativamente com os grupos controle positivo e negativo.

Na análise quantitativa, foi produzida uma solução de 500µL de hidróxido de amônio (NH₄OH 10% em água) e desta solução 200µl foi adicionado aos poços por 15 minutos sobre agitação. Após esse período, 100µl foi transferido para placas de 96 poços e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 405nm e 550nm.

4.7 Avaliação da adesão e morfologia celular

De forma representativa, a morfologia e adesão celular sobre as membranas foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos três primeiros períodos (24 horas, 3, 7 dias) do plaqueamento apenas nos grupos teste 1 e 2. Duas amostras de cada grupo foram fixadas por no mínimo 2 horas em solução de glutaraldeído a 2%, em solução de cacodilato 0.1M e pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M, sendo que a duração de cada lavagem foi de 5 minutos. Depois de fixadas as amostras foram deixadas por 20 minutos em fixador de tetróxido de ósmio 15 e depois submetidas novamente a 3 lavagens em solução tampão de cacodilato 0.1M com duração de 5 minutos cada. As amostras foram desidratadas em soluções progressivas de etanol de 30 a 100% e submetidas à secagem por 20 minutos em hexamethyldisilane HMDS (Microscopia Eletrônica Sciences, Fort Washington, PA, EUA). Posteriormente, as amostras foram fixadas nos *stubs* com fita de carbono dupla face. E então recobertas por uma fina camada de Carbono (25nm) através de revestimento por pulverização catódica (Baltec SCD 500[®]). Foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 650 – FEITM) em equipamento multiusuário do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia Politécnica (Figura 4.4).

A observação da adesão celular na superfície do scaffolds foi realizada em relação à área das amostras do scaffold. O estágio de adesão e espraio celular foram avaliados em relação à morfologia das células, a saber: esféricas, filipódios, lamelipódios e espraçadas nos scaffolds nos períodos de 24h, 3 dias e 7 dias.

Figura 4.4 - Microscópio Eletrônico da Varredura -Departamento de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica da USP

4.8 Análise estatística

Os resultados dos testes de citotoxicidade, das curvas de crescimento e testes de diferenciação foram analisados pelo método ANOVA – 1 critério, complementado pelo teste de Tukey (BioEstat versão 5.0). O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica e microestrutura da blenda polimérica

Macroscopicamente a blenda polimérica se apresentou como um fino lençol de cor branca, liso e flexível. Os scaffolds das blendas poliméricas de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) analisadas por MEV revelaram estruturas porosas com as fibras orientadas de forma aleatória e apresentando superfícies regulares e lisas. O diâmetro médio das fibras das blendas mediu $2.3 (\pm 0.82) \mu\text{m}$, o ângulo de contato $108,45^\circ \pm 3,72^\circ$. Os poros eram irregulares com diâmetro médio de $13,5 \mu\text{m}$ e abertura com área média de $87,14 \mu\text{m}^2$.

5.1.1 Ensaio de Absorção de água (AA%)

As amostras dos scaffolds da blenda polimérica mostraram porcentagem de absorção média de 70% em 24 horas de imersão. Esta porcentagem se manteve estável, sem diferença estatística, até 21 dias (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Porcentagem de absorção de água aferida de 24 horas a 21 dias

5.2 Recaracterização das células tronco

5.2.1 Morfologia Celular

Após o descongelamento (P1) as hDPSCs apresentaram morfologia heterogênea, ora fusiformes ora estreladas. Quando subconfluentes as culturas revelavam células em divisão celular e por vezes apresentavam formatos mais estrelados e estavam mais espalhadas (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Foto micrografia em microscopia de fase aumento original 40X. Cultura subconfluyente em primeira passagem (P1) exibindo células estreladas, espalhadas e em divisão celular (ponta de seta)

5.2.2 Identificação dos imunomarcadores de células tronco

As hDPSCs expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. Os histogramas obtidos por citometria de fluxo das hDPSCs em segunda passagem (P2) estão representados nas figuras 5.3. e 5.4. As culturas expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais (CD44, CD146, STRO-1) e os de células indiferenciadas (Nanog). Os marcadores de células hematopoiéticas (CD45) e endoteliais (CD14) CD34 apresentaram expressão mínima ou não estavam expressados.

Figura 5.3 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs positivas para CD44, CD146, STRO-1 e os de indiferenciação (Nanog). Os gráficos do lado esquerdo indicam porcentagem (%) de células positivas ao anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os gráficos do lado direito mostram negatividade para os controles isotípicos de cada marcador. Os picos cinza-escuro representam a população celular marcada com o anticorpo.

Figura 5.4 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs após o descongelamento na segunda passagem (P2) mostrando expressão mínima ou não expressão para células hematopoiéticas (CD45), endoteliais (CD14) e CD34.

5.3 Viabilidade e curva de crescimento celular

As hDPSCs exibiram morfologia fibroblástica nas culturas nos grupos testes e controles. Não ocorreu formação de zonas de inibição de crescimento celular em nenhum dos tempos experimentais de cultivo até 21 dias. A figura 5.5 apresenta as características morfológicas das células nos diferentes períodos de cultivo nos grupos teste 1, controle negativo e no grupo controle extrato da membrana.

Figura 5.5 - Foto micrografias exibindo hDPSCs em meio clonogênico e em meio condicionado. Em A, D e G grupo controle negativo em 24 horas, 3 e 7 dias, respectivamente, após o plaqueamento. Células em divisão celular (ponta de seta isolada). Em B, E e H células em cultivo no grupo teste 1 nos mesmos períodos. Interface (pontas de seta múltiplas) do scaffold (estrela) com a camada celular exibindo continuidade. Em C, F e I células em cultivo em meio clonogênico condicionado pelo extrato da blenda de PCL/Polioctax. Em 7 dias todos grupos apresentaram confluência em todos o fundo da placa (em aumento original 40X)

As curvas de viabilidade mostraram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as células cultivadas sobre os scaffolds de Poli ϵ -caprolactone/poli(rotaxano e aqueles cultivados no meio condicionado pelo extrato da blenda entre o primeiro e o 14º dia em cultivo. Não houve diferença na proliferação celular entre o grupo extrato do scaffold e o controle negativo no mesmo período. Células cultivadas no período de 7 e 14 dias sobre os scaffolds (grupo teste 1) e sob cultivo em meio condicionado pelo extrato do scaffold mostraram maior viabilidade ($p < 0.01$). Não houve diferença estatística entre os grupos em 21 dias de cultivo (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Curva de crescimento das hDPSC nos grupos controle negativo, teste 1 e condicionado (extrato da membrana).

Letras minúsculas diferentes mostram crescimento significativo quando $p < 0.01$. Letras maiúsculas diferentes mostram crescimento significativo quando $p < 0.05$. **NS** significa que não houve diferença estatística. Os dados estão apresentados em média e barras de desvio padrão. – Teste Anova-1

5.4 Diferenciação celular

As hDPSCs exibiram morfologia fibroblástica nas culturas nos grupos teste 1 e controle positivo. Não ocorreu formação de zonas de inibição de crescimento celular em nenhum dos tempos experimentais de cultivo até 21 dias. A figura 5.7 apresenta as características morfológicas das células nos diferentes períodos de cultivo nos grupos teste 2 e controle positivo.

Figura 5.7 - Foto micrografias exibindo hDPSCs em meio mineralizante. Em A, C E e G grupo teste 2 em 24 horas, 3, 7 e 21 dias, respectivamente, após o plaqueamento. Células em divisão celular (ponta de seta isolada). Interface (pontas de seta múltiplas) do scaffold (estrela) da blenda de PCL/Polirotax e a camada celular exibindo continuidade. Em B, D F e H células em cultivo no grupo controle positivo nos mesmos períodos (aumento original)

Figura 5.8 - Curva de crescimento celular das hDPSC em meio mineralizante. - * diferença estatisticamente significativa quando $p < 0.01$, § significativo quando $p < 0.05$. **ns** sem diferença significativa. Anova-1 médias e desvios-padrão

Os ensaios de proliferação celular foi conduzido nos período de 24 horas, 3 , 7 14 e 21 dias. O crescimento celular foi significativamente maior no grupo Teste 2 do que no grupo controle positivo até o 7º dia. Houve crescimento celular significativamente maior no grupo controle positivo em 14 de cultivo. Após 21 dias de cultivo não há diferença de crescimento celular entre os grupos (Figura 5.8).

5.4.1 Quantificação da atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) em 14 dias foi similar em todos os grupos experimentais. O ensaio realizado não mostrou atividade da enzima em nenhum dos grupos estudados. Observou-se que o teste utilizado não foi adequado para mostrar os resultados esperados (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Resultado do ensaio de Atividade de fosfatase alcalina

5.4.2 Formação de nódulos de mineralização

O ensaio do vermelho de Alizarina revelou em 21 dias intensa coloração vermelha nos grupos Teste 2 e controle positivo. A figura 5.10 ilustra culturas tratadas pelo ensaio de Vermelho de Alizarina de todos os grupos experimentais em 21 dias. Nódulos de mineralização de cor avermelhada são observados em diferentes densidades nos diferentes grupos experimentais, sendo que no grupo teste 2 em meio mineralizante esta coloração é mais exuberante e distribuída por toda a cultura celular. Foi observado após a remoção do meio da reação que os scaffolds presentes no meio de cultivo clonogênico (teste 1) após 21 dias exibiram marcas mais avermelhadas em sua superfície. A análise quantitativa revelou que a presença dos scaffolds promoveu uma maior intensidade de formação de 'mineralizações do que nos grupos controle (Figura 5.11).

Figura 5.10 - Poços de cultivo de hDPSCs após 21 dias. Em **A** cultura em meio clonogênico após a reação pelo vermelho de alizarina em **B** scaffold com cultura celular em meio clonogênico (teste1) exibindo marcas avermelhadas na superfície. Em **C** cultivo em meio mineralizante ponta de seta evidencia formação de nódulo de mineralização (controle positivo) e em **D** cultivo na presença do scaffold (Teste 2) com intensa coloração vermelha do meio após reação. Em **E** e **F** Fotomicrografia das células cultivadas em meio mineralizante no controle positivo e no teste 2 respectivamente (pontas de seta) evidenciando nódulos de mineralização (aumento original 40X)

Figura 5.11 - Poços de cultivo de hDPSCs em 21 dias após a remoção da solução da reação do ensaio de Vermelho de alizarina. Em **A** scaffold com cultura celular em meio clonogênico exibindo marcas avermelhadas na superfície (pontas de seta) **B**. laminula de vidro (controle negativo) em meio clonogênico após a reação pelo vermelho de alizarina. Em **C** scaffold (Teste 2) com intensa coloração vermelha (ponta de seta) formação de nódulo de mineralização (controle positivo) e em **D** laminula de vidro (controle positivo) e nódulos de mineralização (pontas de seta). Abaixo o gráfico de colunas ilustra as médias e desvio-padrão e as diferenças estatísticas evidenciando as diferenças de densidade óptica da reação do Vermelho de alizarina indicando mineralização nas culturas dos grupos teste 2 e controle positivo. * significativo $p < 0.05$ – Anova 1

5.5 Avaliação da adesão e morfologia celular

A morfologia das hDPSCs sobre os scaffolds na análise por MEV mostrou que as células aderiram de forma semelhante quando cultivadas nos meios clonogênico e mineralizante. Após um dia de cultivo pequenos agrupamentos de células já se apresentavam de forma esparada sobre os scaffolds e após 3 dias assumiam morfologia estrelada com filipódios indicando adesão e proliferação. Após 7 dias foram observadas células entremeadas pelas fibras da blenda e lençóis celulares em monocamada recobrimo quase que a totalidade da superfície dos scaffolds. As células aparecem aderidas em lençóis extensos em ambos os grupos teste 1 e 2. A figura 5.12 ilustra a adesão e a morfologia das camadas celulares.

Figura 5.12 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura dos scaffolds com a adesão celular em forma de células isoladas e agrupadas nos primeiros períodos 24h e 3 dias e em lençóis de monocamadas em 7 dias. Aumento original 600x

Clonogênico

Mineralizante

6 DISCUSSÃO

As terapias atuais para regeneração de tecido disponíveis para correção de defeitos ósseos por meio de enxertos nem sempre são satisfatórias e podem apresentar uma série de complicações. Avaliar a citotoxicidade, viabilidade e potencial osteogênico de um scaffold polimérico com o objetivo de possibilitar sua funcionalização pelo cultivo de células tronco pode ser um grande avanço nas alternativas para reabilitação morfofuncional baseada na bioengenharia. Esse estudo apresenta uma membrana com potencial para ser utilizada como scaffold para transferência de células com o propósito de regeneração tecidual, mais especificamente regeneração óssea.

O scaffold estudado foi composto por uma blenda polimérica com nano fibras de dois polímeros um hidrofóbico e um hidrofílico - poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). Morfologicamente, o scaffold em disco apresentou-se fino, liso e flexível com características anfifílicas. Esta última característica foi aferida pelo teste de absorção, onde foi constatado que a massa do scaffold foi maior quando imersa em solução aquosa, indicando absorção de líquido pelo material, com porcentagem de reabsorção de 70%, essa taxa se encontra dentro da média relatada em estudos anteriores com a utilização de scaffolds (19, 66). Essa característica é de extrema importância, pois a hidrofiliabilidade do material garante a existência de porosidade, adsorção do meio de cultivo que melhora a distribuição de nutrientes, que é essencial para a adesão, proliferação e diferenciação celular (24, 61, 66). Um material muito hidrofóbico poderia limitar a colonização celular e, por conseguinte dificultar a futura formação de um novo tecido (18). Este resultado se deve à presença do poli(rotaxano), que garante a hidrofiliabilidade do scaffold, pois o PCL já é conhecido por apresentar alta hidrofobicidade, o que poderia apresentar uma limitação para aplicações em engenharia tecidual (64). Quanto à porosidade do scaffold utilizado, o diâmetro médio dos poros 13,5 micrometros e a área média de abertura de $87.14 \mu\text{m}^2$, valores esses que se encontram bastante variáveis na literatura (31, 79) parecem demonstrar influência na facilitação da interação celular, principalmente quando há a interconectividade desses poros, como foi observado nesse scaffold.

A recharacterização imunofenotípica das hDPSCs por citometria do fluxo, foi importante para que se tivesse certeza de que as células tronco não perderam suas características devido os processos de descongelamento, armazenagem e re-congelamento. Sendo assim, marcadores clássicos para células tronco foram utilizados (26, 27). O resultado apresentou expressão positiva para os marcadores preponderantes de células tronco indiferenciadas, como outros autores já descreveram (20). Re-caracterizar as células que estão sendo utilizadas para funcionalização do biomaterial é fundamental para se certificar do potencial de diferenciação. O tipo celular empregado foi proveniente de polpa dentária (hDPSC) de molares de dentes adultos humanos. Os terceiros molares em muitos casos têm indicação para serem removidos e sua extração é um procedimento rotineiro ao cirurgião bucomaxilofacial. A origem deste tipo celular seria desta forma relativamente simples de ser obtida e em estudos clínicos futuros poderá ser uma fonte facilitadora de cultivo de células tronco.

No teste de atividade mitocondrial mostrou que houve o crescimento progressivo na presença dos scaffolds, o que pode ser explicado provavelmente devido a maior superfície de contato frente à morfologia tridimensional do scaffold e a sua porosidade, dessa forma houve espaço para maior quantidade de células proliferarem, até que as porosidades estivessem preenchidas. Durante o período de cultivo não houve inibição de contato celular na interface scaffold/ células, o que demonstra biocompatibilidade.

Outros estudos semelhantes de funcionalização de scaffolds por células tronco não apontaram essas características de compatibilidade na interface, provavelmente porque os ensaios descritos utilizavam placas com poços no mesmo tamanho dos scaffolds, o que devia impedir essa observação (71, 78). Tivemos aqui a preocupação de limitar a contagem de células aderidas e que proliferaram sobre os scaffolds comparando com a mesma área de superfície dos controles em lamínulas de vidro, porque seria a única forma de garantir que apenas as células sobre o biomaterial seriam consideradas na comparação dos grupos evitando o viés de outros estudos (14, 49).

O teste para a identificação de fosfatase alcalina utilizado não mostrou resposta significativa, o que confirmou o resultado de trabalhos anteriores onde foi aplicado o teste do mesmo fabricante (Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Todavia, os

resultados encontrados durante o teste de atividade mitocondrial comparando os grupos utilizando meio mineralizante explicou o resultado apresentado no ensaio de vermelho de Alizarina e dão consistência ao fato de que as hDPSC provavelmente se diferenciaram em células ósseas, devido a presença dos nódulos de mineralização como apresentado em estudos anteriores (14, 15, 56). O processo de diferenciação celular foi realizado para se analisar o potencial de funcionalização por células já diferenciadas para a formação de tecido ósseo. A morfologia celular em meio de diferenciação ou mineralizante foi similar à cultura em meio clonogênico, mantendo a compatibilidade na interface e a confluência no fundo dos poços.

A tentativa de explicar a curva de crescimento no meio mineralizante até 14 dias leva a resultados comparáveis ao meio clonogênico. Possivelmente, sobre a membrana o crescimento em meio de diferenciação foi maior pelo mesmo motivo que o meio clonogênico, devido a área de contato da membrana. Em 21 dias o crescimento se estabilizou como esperado devido o processo de diferenciação celular, acredita-se que as células passam a apresentar funções especializadas voltadas para o processo de diferenciação, consequentemente perdendo a capacidade de divisão celular (21).

O resultado do vermelho de Alizarina dá consistência à ideia de que as hDPSCs provavelmente se diferenciaram em células ósseas, a positividade desse ensaio, reforça nossa percepção de que o teste utilizado para fosfatase alcalina foi inadequado para esse ensaio, outro tipo de teste deverá ser realizado para se confirmar este resultado.

Foi interessante perceber que mesmo na ausência do meio mineralizante, observou-se a presença de marcas avermelhadas sobre os scaffolds, provavelmente caracterizando a presença de nódulos de calcificação. Ao observarmos a curva de crescimento com meio clonogênico, principalmente aos 7 dias, observamos que os resultados de crescimento celular foram similares quando a membrana estava presente ou não (meio condicionado). Parece que o material do scaffold possivelmente libere substâncias que favoreçam esse crescimento. A presença do rotaxano que apresenta efeito ósseo anabólico, como descrito anteriormente (51, 70) poderia explicar parcialmente esse resultado. Acreditamos que esse biomaterial possa apresentar algum tipo de estímulo para a diferenciação. Um resultado interessante que irá suscitar estudos futuros para comprovar o real potencial osteogênico dessa blenda polimérica.

Quando observadas as imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as características morfológicas da membrana apresentaram variação ao longo do período de cultivo. As geometrias circulares ou ovóides das células nos primeiros períodos apresentaram-se com poucas ramificações, depois ao final de sete dias elas apresentaram um aspecto mais filamentososo e achatado com grande ramificações e interconectividade. Características que nos levam a inferir que houve adesão celular com interações células/scaffold e célula/célula conforme outros estudos relataram, quando houve a utilização de blendas poliméricas (16, 67).

Macroscopicamente pudemos observar que o biomaterial apresentado possui uma limitação em sua confecção referente à padronização. Os excelentes resultados apresentados *in vitro* devem estimular uma melhor padronização nos métodos de confecção e de conformação dessa membrana para tornar os resultados mais reprodutíveis e facilitar a manufatura de um biomaterial promissor comercialmente.

Estudos com biologia molecular com expressão gênica das proteínas envolvidas no processo de diferenciação e desenvolvimento de matriz provavelmente osteogênica sobre essas membranas, serão conduzidos no futuro para se comprovar e dar mais consistência nos resultados aqui apresentados. A quantificação de proteínas geradas em cultura pelas células em diferentes condições, meio clonogênico, meio condicionado e meio mineralizante sobre o scaffold poderá responder se o biomaterial tem alguma ação sobre a diferenciação celular.

Outro fator bastante importante se trata da questão ética da realização destes estudos, além disso, o refinamento da técnica, como a caracterização das diferentes populações celulares, padronização dos protocolos nos ensaios clínicos são alguns dos obstáculos a serem vencidos para que então se dê início a utilização da terapia com células tronco na prática cotidiana.

Finalmente, os scaffolds de compostos pela blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) apresentaram biocompatibilidade *in vitro*, revelando aspectos promissores de serem funcionalizados por células tronco derivadas de polpa dentária humana com potencial de uso como biomaterial bioativo para bioengenharia de tecido ósseo.

7 CONCLUSÃO

A blenda poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) mostrou:

- Não apresentar citotoxicidade para as hDPSCs;
- Potencial de funcionalização por células tronco com diferenciação celular, formação de nódulos de mineralização e adesão celular.

REFERÊNCIAS¹

1. Misch CM. Maxillary autogenous bone grafting. *Dent Clin North Am.* 2011;55(4):697-713.
2. Boeckel DG, Shinkai RS, Grossi ML, Teixeira ER. Cell culture-based tissue engineering as an alternative to bone grafts in implant dentistry: a literature review. *J Oral Implantol.* 2012;38 Spec No:538-45.
3. Cordaro L. Bilateral simultaneous augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible. Report of a technique and preliminary results. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(2):201-6.
4. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation. A comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol.* 2012, May 22.
5. Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, et al. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(4):346-53.
6. Kim S, Jung UW, Lee YK, Choi SH. Effects of biphasic calcium phosphate bone substitute on circumferential bone defects around dental implants in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(2):265-73.
7. Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24 Suppl:218-36.
8. Sbordon C, Toti P, Guidetti F, Califano L, Santoro A, Sbordon L. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(11):2559-65.
9. Annibali S, Bignozzi I, Sammartino G, La Monaca G, Cristalli MP. Horizontal and vertical ridge augmentation in localized alveolar deficient sites: a retrospective case series. *Implant Dent.* 2012;21(3):175-85.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

10. Misch CM. Autogenous bone: is it still the gold standard? *Implant Dent.* 19. United States, 2010. p. 361.
11. Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg.* 2012;23(1):323-7.
12. Jones AC, Milthorpe B, Averdunk H, Limaye A, Senden TJ, Sakellariou A, et al. Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging. *Biomaterials.* 2004;25(20):4947-54.
13. Kulkarni A, Bambole VA, Mahanwar PA. Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering.* 2010;49(5):427-41.
14. Soliman S, Pagliari S, Rinaldi A, Forte G, Fiaccavento R, Pagliari F, et al. Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. *Acta Biomater.* 2010;6(4):1227-37.
15. Wang C, Lin K, Chang J, Sun J. Osteogenesis and angiogenesis induced by porous beta-CaSiO(3)/PDLGA composite scaffold via activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biomaterials.* 2013;34(1):64-77.
16. Changotade S, Radu Bostan G, Consalus A, Poirier F, Peltzer J, Lataillade JJ, et al. Preliminary in Vitro Assessment of Stem Cell Compatibility with Cross-Linked Poly(ϵ -caprolactone urethane) Scaffolds Designed through High Internal Phase Emulsions. *Stem Cells International.* 2015; 2015:283796. doi: 10.1155/2015/283796. Epub 2015 May 28.
17. Jensen J, Tvedesoe C, Rolting JH, Foldager CB, Lysdahl H, Kraft DC, et al. Dental pulp-derived stromal cells exhibit a higher osteogenic potency than bone marrow-derived stromal cells in vitro and in a porcine critical-size bone defect model. *Sicot j.* 2016; Apr 20;2:16. doi: 10.1051/sicotj/2016004.
18. Keskar V, Marion NW, Mao JJ, Gemeinhart RA. In vitro evaluation of macroporous hydrogels to facilitate stem cell infiltration, growth, and mineralization. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(7):1695-707.
19. Zhang Y, Fan W, Ma Z, Wu C, Fang W, Liu G, et al. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. *Acta Biomater.* 2010;6(8):3021-8.

20. Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(3):235-42.
21. Brown G, Hughes PJ, Michell RH. Cell differentiation and proliferation--simultaneous but independent? *Exp Cell Res*. 2003;291(2):282-8.
22. Chen L, Bai Y, Liao G, Peng E, Wu B, Wang Y, et al. Electrospun poly(L-lactide)/poly(epsilon-caprolactone) blend nanofibrous scaffold: characterization and biocompatibility with human adipose-derived stem cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e71265.
23. Zhang Z, Li F, Tian H, Guan K, Zhao G, Shan J, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells toward nucleus pulposus-like cells induced by hypoxia and a three-dimensional chitosan-alginate gel scaffold in vitro. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(2):314-21.
24. Zhu Y, Liu T, Song K, Jiang B, Ma X, Cui Z. Collagen-chitosan polymer as a scaffold for the proliferation of human adipose tissue-derived stem cells. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2009;20(3):799-808.
25. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016;143(13):2273-80.
26. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
27. Wang L, Zhang C, Li C, Weir MD, Wang P, Reynolds MA, et al. Injectable calcium phosphate with hydrogel fibers encapsulating induced pluripotent, dental pulp and bone marrow stem cells for bone repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;69:1125-36.
28. Jahanbin A, Rashed R, Alamdari DH, Koohestanian N, Ezzati A, Kazemian M, et al. Success of Maxillary Alveolar Defect Repair in Rats Using Osteoblast-Differentiated Human Deciduous Dental Pulp Stem Cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;74(4):829.e1-9.

29. Zhang J, Lu X, Feng G, Gu Z, Sun Y, Bao G, et al. Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell Tissue Res*. 2016;366(1):129-42.
30. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
31. Mohan N, Nair PD, Tabata Y. Growth factor-mediated effects on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D semi-IPN poly(vinyl alcohol)-poly(caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(1):146-59.
32. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, et al. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *Int J Oral Sci*. 2014;6(2):87-93.
33. Clementini M, Morlupi A, Canullo L, Agrestini C, Barlattani A. Success rate of dental implants inserted in horizontal and vertical guided bone regenerated areas: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(7):847-52.
34. Handelsman M, Celletti R. Alveolar ridge augmentation using membranes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2004;16(1):33-9, vi.
35. Urban IA, Lozada JL, Jovanovic SA, Nagursky H, Nagy K. Vertical ridge augmentation with titanium-reinforced, dense-PTFE membranes and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 19 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(1):185-93.
36. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(6):567-76.
37. Carbonell JM, Martin IS, Santos A, Pujol A, Sanz-Moliner JD, Nart J. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(1):75-84.
38. Schneider D, Weber FE, Grunder U, Andreoni C, Burkhardt R, Jung RE. A randomized controlled clinical multicenter trial comparing the clinical and histological performance of a new, modified polylactide-co-glycolide acid membrane to an expanded polytetrafluoroethylene membrane in guided bone regeneration procedures. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(2):150-8.

39. Chawla R, Tan A, Ahmed M, Crowley C, Moimen NS, Cui Z, et al. A polyhedral oligomeric silsesquioxane-based bilayered dermal scaffold seeded with adipose tissue-derived stem cells: In vitro assessment of biomechanical properties. *J Surg Res.* 2014;188(2):361-72.
40. Proussaefs P, Lozada J. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation: a pilot study. *J Prosthet Dent.* 2003;90(6):530-8.
41. Urban IA, Nagursky H, Lozada JL, Nagy K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013;33(3):299-307.
42. Jegoux F, Aguado E, Cognet R, Malard O, Moreau F, Daculsi G, et al. Alveolar ridge augmentation in irradiated rabbit mandibles. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(4):1519-26.
43. Urban IA, Nagursky H, Lozada JL. Horizontal ridge augmentation with a resorbable membrane and particulated autogenous bone with or without anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 22 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(2):404-14.
44. Lee JS, Ko SH, Kim YT, Jung UW, Choi SH. Guided bone regeneration using cyanoacrylate-combined calcium phosphate in a dehiscence defect: a histologic study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(9):2070-9.
45. Kim BS, Sung HM, You HK, Lee J. Effects of fibrinogen concentration on fibrin glue and bone powder scaffolds in bone regeneration. *J Biosci Bioeng.* 2014;118(4):469-75.
46. Xue D, Zheng Q, Zong C, Li Q, Li H, Qian S, et al. Osteochondral repair using porous poly (lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(1):259-70.
47. Liu Y, Fox V, Lei Y, Hu B, Joo KI, Wang P. Synthetic niches for differentiation of human embryonic stem cells bypassing embryoid body formation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(5):1101-12.

48. Ahtiainen K, Sippola L, Nurminen M, Mannerstrom B, Haimi S, Suuronen R, et al. Effects of chitosan and bioactive glass modifications of knitted and rolled polylactide-based 96/4 L/D scaffolds on chondrogenic differentiation of adipose stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(1):55-65.
49. Costa-Pinto AR, Salgado AJ, Correlo VM, Sol P, Bhattacharya M, Charbord P, et al. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(6):1049-57.
50. Oliveira JT, Correlo VM, Sol PC, Costa-Pinto AR, Malafaya PB, Salgado AJ, et al. Assessment of the suitability of chitosan/polybutylene succinate scaffolds seeded with mouse mesenchymal progenitor cells for a cartilage tissue engineering approach. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(10):1651-61.
51. Schutgens EM, Tryfonidou MA, Smit TH, Cumhur Öner F, Krouwels A, Ito K, et al. Biomaterials for intervertebral disc regeneration: Past performance and possible future strategies. *Eur Cell Mater.*. 2015;30:210-31.
52. Fedorovich NE, Kuipers E, Gawlitta D, Dhert WJ, Alblas J. Scaffold porosity and oxygenation of printed hydrogel constructs affect functionality of embedded osteogenic progenitors. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(19-20):2473-86.
53. Re'em T, Tsur-Gang O, Cohen S. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGFbeta1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(26):6746-55.
54. Namba RM, Cole AA, Bjugstad KB, Mahoney MJ. Development of porous PEG hydrogels that enable efficient, uniform cell-seeding and permit early neural process extension. *Acta Biomater*. 2009;5(6):1884-97.
55. Kubinová S. New trends in spinal cord tissue engineering. *Future Neurology*. 2015;10(2):129-45.
56. Chen G, Lv Y, Dong C, Yang L. Effect of internal structure of collagen/hydroxyapatite scaffold on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2015;10(2):99-108.
57. Kwak S, Haider A, Gupta KC, Kim S, Kang IK. Micro/Nano Multilayered Scaffolds of PLGA and Collagen by Alternately Electrospinning for Bone Tissue Engineering. *Nanoscale Res Lett*. 2016;11(1):323.

58. Van Noort R, Barbour ME. Introduction to Dental Materials4: Introduction to Dental Materials: Elsevier Health Sciences; 2013.
59. Liu Y, Fox V, Lei Y, Hu B, Joo KI, Wang P. Synthetic niches for differentiation of human embryonic stem cells bypassing embryoid body formation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(5):1101-12.
60. Garg K, Bowlin GL. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. 2011;5(1):13403.
61. Zheng X, Yang F, Wang S, Lu S, Zhang W, Liu S, et al. Fabrication and cell affinity of biomimetic structured PLGA/articular cartilage ECM composite scaffold. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(3):693-704.
62. Xiang P, Wu KC, Zhu Y, Xiang L, Li C, Chen DL, et al. A novel Bruch's membrane-mimetic electrospun substrate scaffold for human retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials*. 2014;35(37):9777-88.
63. Jang YJ, Chun SY, Kim GN, Kim JR, Oh SH, Lee JH, et al. Characterization of a novel composite scaffold consisting of acellular bladder submucosa matrix, polycaprolactone and Pluronic F127 as a substance for bladder reconstruction. *Acta Biomater*. 2014;10(7):3117-25.
64. Domingos M, Intranuovo F, Russo T, De Santis R, Gloria A, Ambrosio L, et al. The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(epsilon-caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability. *Biofabrication*. 2013;5(4):045004.
65. Patlolla A, Collins G, Arinzeh TL. Solvent-dependent properties of electrospun fibrous composites for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2010;6(1):90-101.
66. Seyednejad H, Gawlitta D, Dhert WJ, van Nostrum CF, Vermonden T, Hennink WE. Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on a functionalized polyester for bone tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2011;7(5):1999-2006.
67. Huang W, Shi X, Ren L, Du C, Wang Y. PHBV microspheres--PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(15):4278-85.

68. Li JJ, Zhao F, Li J. Polyrotaxanes for applications in life science and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(2):427-43.
69. Fraceto LF, Gonçalves MM, Moraes CM, Araújo DRd, Zanella L, Paula Ed, et al. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: beta-ciclodextrina. *Química Nova*. 2007;30(5):1203-7.
70. Garcia-Rio L, Otero-Espinar FJ, Luzardo-Alvarez A, Blanco-Mendez J. Cyclodextrin based rotaxanes, polyrotaxanes and polypseudorotaxanes and their biomedical applications. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(4):478-93.
71. Gautam S, Chou CF, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;34:402-9.
72. Meng Z, Zheng W, Li L, Zheng Y. Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL–MWCNTs by electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*. 2010;30(7):1014-21.
73. Harada A, Hashidzume A, Yamaguchi H, Takashima Y. Polyrotaxanes. *Encyclopedia Of Polymer Science and Technology*. 1998.
74. Okumura Y, Ito K. The polyrotaxane gel: A topological gel by figure-of-eight cross-links. *Advanced Materials*. 2001;13(7):485-7.
75. Araki J, Ito K. Recent advances in the preparation of cyclodextrin-based polyrotaxanes and their applications to soft materials. *Soft Matter*. 2007;3(12):1456-73.
76. Hofmann S, Hagenmuller H, Koch AM, Muller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(6):1152-62.
77. Pisanti P, Yeatts AB, Cardea S, Fisher JP, Reverchon E. Tubular perfusion system culture of human mesenchymal stem cells on poly-L-lactic acid scaffolds produced using a supercritical carbon dioxide-assisted process. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(10):2563-72.

78. Hamajima S, Hayashi T, Sato Y, Sasaki K, Kawai T. Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. *Dent Mater J*. 2011;30(5):707-16.
79. Phadke A, Hwang Y, Kim SH, Yamaguchi T, Masuda K, Varghese S. Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater*. 2013;25:114-28; discussion 28-9.
80. Bertolai R, Catelani C, Aversa A, Rossi A, Giannini D, Bani D. Bone graft and mesenchymal stem cells: clinical observations and histological analysis. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2015;12(2):183-7.
81. Wildburger A, Payer M, Jakse N, Strunk D, Etchard-Liechtenstein N, Sauerbier S. Impact of autogenous concentrated bone marrow aspirate on bone regeneration after sinus floor augmentation with a bovine bone substitute--a split-mouth pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(10):1175-81.
82. Chen FM, Gao LN, Tian BM, Zhang XY, Zhang YJ, Dong GY, et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:33.
83. Kaigler D, Avila-Ortiz G, Travan S, Taut AD, Padial-Molina M, Rudek I, et al. Bone Engineering of Maxillary Sinus Bone Deficiencies Using Enriched CD90+ Stem Cell Therapy: A Randomized Clinical Trial. *J Bone Miner Res*. 2015;30(7):1206-16.
84. Rickert D, Sauerbier S, Nagursky H, Menne D, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(3):251-8.
85. Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, Tatsui NH, da Costa Neves A, Bueno DF, et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs*. 2007;31(4):268-73.
86. Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(3):201-9.
87. Diniz IMA. Diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco mesenquimais fotomoduladas em hidrogel com incorporação de proteína morfogenética óssea 4: [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da FOU SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Avaliação da viabilidade, proliferação e potencial osteogênico de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre membranas de PCL/Poli(rotaxano)

Pesquisador: Natacha Kalline de Oliveira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 43751015.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.402.217

Apresentação do Projeto:

Membranas com o propósito de promover a regeneração óssea guiada (ROG) foram desenvolvidas através de estudos de regeneração tecidual. Sendo que uma nova membrana foi desenvolvida e doada pelo Departamento de Engenharia de Materiais da UNICAMP e que não existam estudos in vitro que comprovem ou não a biocompatibilidade da mesma com os tecidos biológicos, este trabalho tem o objetivo de avaliar in vitro o comportamento biológico quanto à citotoxicidade da membrana de PCL/polirotaxano utilizando células tronco de polpa dentária humana.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar viabilidade e a proliferação de células tronco da polpa dentária humana cultivadas sobre membranas poliméricas compostas de PCL/Polirotaxano

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, segundo os pesquisadores, pois serão utilizadas células congeladas.

Não haverá benefício direto para os pacientes que doaram as células que serão usadas neste trabalho.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores esclareceram todas as dúvidas anteriores.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7980 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.402.217

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram anexados, como formulário do projeto, projeto completo, folha de rosto e carta de autorização para a utilização do laboratório de pesquisa.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências nesta emenda.

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_INFORMACOES_BASICAS_608896_E1.pdf	21/01/2016 08:45:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoemenda.docx	21/01/2016 08:42:25	Maria Cristina Zindel Deboni	Aceito
Outros	resposta.doc	21/01/2016 08:27:50	Maria Cristina Zindel Deboni	Aceito
Outros	carta.pdf	21/01/2016 08:24:18	Maria Cristina Zindel Deboni	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoemenda.pdf	20/01/2016 14:00:19	Maria Cristina Zindel Deboni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.402.217

SAO PAULO, 03 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br