

CAMILLA MAGNONI MORETTO NUNES

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL SUBMETIDAS À ASSOCIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS
E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
São José dos Campos.

Supervisor(a): Prof. Tit. Maria Aparecida
Neves Jardim

São José dos Campos

2025

SUMÁRIO

RESUMO	3
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Delineamento experimental <i>in vitro</i>	6
Preparo do i-PRF e do meio de cultura enriquecido com i-PRF	7
Plaqueamento das células mesenquimais do ligamento periodontal (PDLSCs)	8
Viabilidade celular (citotoxicidade).....	9
Avaliação da atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total.....	9
Quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização	10
Análise estatística	10
RESULTADOS	10
Viabilidade celular (citotoxicidade).....	10
Avaliação da atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total.....	11
Quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização	12
DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO.....	15
Conflito de interesses	15
REFERÊNCIAS.....	15

RESUMO

A doença periodontal é caracterizada pela inflamação relacionada ao biofilme dental e mediada pelo hospedeiro, que tem como consequência a destruição progressiva do aparelho de inserção dental. A terapia padrão ouro visa a eliminação do processo inflamatório e obtenção de tecidos e uma microbiota compatíveis com a saúde, entretanto, em alguns casos isto não é possível. Desta forma, terapias com antibióticos são aplicadas associadas ao tratamento periodontal para alcançar o sucesso. Os antibióticos podem ser administrados sistêmica ou localmente, sendo que maiores efeitos adversos são relatados quando utilizados sistemicamente. As pesquisas atuais têm desenvolvido e aplicado e tecnologias inovadoras baseadas em células, estruturas bioativas e biomiméticas para o tratamento das doenças periodontais, especialmente na liberação de drogas e moléculas bioativas. A fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) tem revelado um potencial benéfico quando utilizada nos processos regenerativos, e devido suas características, é capaz de incorporar agentes ativos, como os antibióticos revelando-se eficaz tanto no efeito antimicrobiano quanto na aceleração do processo de cicatrização. Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento *in vitro* das células mesenquimais do ligamento periodontal (PDLSCs) submetidas à associação de antibióticos e fibrina rica em plaquetas injetável. Para isso, o i-PRF foi incorporado aos antibióticos amoxicilina e metronidazol, em diferentes concentrações, e verificadas as atividades das PDLSCs por meio de testes *in vitro*. Os resultados da viabilidade celular revelaram que o grupo I, a viabilidade celular foi maior em comparação aos grupos com antibióticos em diferentes concentrações ($p < 0.0001$). No grupo A₁₀, a viabilidade celular foi maior em comparação ao grupo A₅, e aos grupos com metronidazol M₅ e M₁₀ ($p < 0.0001$). Para a avaliação da atividade da fosfatase alcalina e do conteúdo de proteína total não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais ($p > 0.05$). Para a quantificação do cálcio nos nódulos de mineralização o grupo I apresentou quantidade estatisticamente maior em comparação aos grupos A₅ ($p = 0.0075$), M₅ ($p = 0.0006$) e ao M₁₀ ($p = 0.0321$). Pode-se concluir que o i-PRF proporcionou benefícios para a cultura celular, principalmente em relação à presença de maior quantidade de nódulos de mineralização e na viabilidade celular, sendo um material promissor para a Odontologia.

Palavras-chave: Fibrina Rica em Plaquetas. Antibacterianos. Células-Tronco.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença imunoinflamatória crônica caracterizada por inflamação relacionada ao biofilme e mediada pelo hospedeiro. Clinicamente, observa-se a destruição progressiva e irreversível do aparelho de inserção dentário com comprometimento da função e estética dentária (Kinane et al., 2017; Papapanou et al., 2018). O impacto da destruição periodontal pode resultar em reabsorção patológica do osso alveolar com possível formação de defeitos ósseos complexos (Avila-Ortiz et al., 2015; Könönen et al., 2019).

O tratamento periodontal padrão ouro visa eliminar a progressão do processo infeccioso e promover o controle da inflamação, por meio da remoção mecânica do biofilme e alisamento radicular, resultando em uma redução nos níveis de alguns patógenos periodontais, mas tal mudança na composição do biofilme subgengival não é mantida de forma definitiva. Desta forma, terapias adjuvantes, como o uso de antibióticos, têm sido utilizadas para potencializar os efeitos do tratamento periodontal (Feres et al., 2015).

Os antibióticos podem ser usados local ou sistemicamente. O uso de antibióticos sistêmicos embora eficaz pode apresentar algumas desvantagens sobre aplicações locais, incluindo reações corporais adversas, incerteza sobre a colaboração do paciente com o tratamento e menor concentração da droga nos sítios subgengivais. Além disso, o uso local de antibióticos pode reduzir o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana (Rams, Slots, 1996; Feres et al., 2015).

O foco atual das pesquisas envolve o desenvolvimento e aplicação de tecnologias inovadoras baseadas em células, estruturas bioativas e biomiméticas (Liu et al., 2019, Farshidfar et al., 2022) para o tratamento periodontal. Neste contexto, com os adventos da Engenharia Tecidual, os concentrados do sangue periférico têm sido propostos como biomateriais em potencial para aplicações complexas de engenharia tecidual (Choukroun, Ghanaati, 2017) e como um inovador sistema de liberação de biomoléculas Miron e Zhang (2018).

Estudos desses concentrados de sangue periférico por Choukroun et al. (2001) propiciaram o desenvolvimento de um protocolo de concentrado de plaquetas, nomeado fibrina rica em plaquetas (PRF). Este biomaterial acumula glicosaminoglicanos, plaquetas e leucócitos provenientes do sangue. As plaquetas e os leucócitos são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformante b (TGFb), o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF). Esses fatores de crescimento desempenham um papel fundamental nas fases iniciais da cicatrização devido à sua capacidade de estimular a migração e a proliferação celular, e de induzir formação da matriz de fibrina (Dohan et al., 2006). Além disso, a angiogênese promovida pela matriz de

fibrina é facilitada pela estrutura tridimensional do coágulo formado juntamente com a ação de citocinas presentes em sua matriz, e pela ação de fatores de crescimento solúveis como o fator de crescimento fibroblástico b (FGFb), VEGF e PDGF, incorporados no coágulo (Choukroun et al., 2006).

A utilização da forma líquida do PRF, fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) que também contém células-tronco com alto potencial regenerativo (Abd El Raouf et al., 2019), é capaz de incorporar agentes ativos auxiliares no processo de regeneração tanto de tecidos moles quanto mineralizados (Kumar, Shubhashini, 2013; Miron et al., 2017). A associação do i-PRF aos antibióticos mostra-se eficaz tanto no efeito antimicrobiano quanto na aceleração do processo de cicatrização (Knafl, Thalhammer, Vossen, 2017; Polak, Clemer-Shamai, Shapira, 2019).

Em relação à tecnologia baseada em células, as células mesenquimais dos tecidos periodontais (PDLSCs) possuem um potencial exclusivo para regenerar os complexos tecidos do periodonto pela capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos, cementoblastos e condrócitos, e por apresentarem as características morfológicas e estruturais típicas destas células (Trubiani et al., 2019; Mendoza et al., 2023). São capazes também de expressar os seus marcadores de superfície específicos (Wang et al., 2016; Duan et al., 2018; Queiroz et al., 2021) e de exercerem funções parácrinas, por meio de biomoléculas ativas. Desta maneira podem atuar estimulando as células progenitoras do hospedeiro e modulando células imunitárias e, assim, desempenhando papéis cruciais na regeneração do periodonto de sustentação (Shanbhag et al., 2019, de Lima Barbosa et al., 2023; Esmaeilnejad et al., 2023).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o comportamento *in vitro* das células mesenquimais do ligamento periodontal submetidas à associação de antibióticos e fibrina rica em plaquetas injetável.

OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o comportamento *in vitro* das células mesenquimais do ligamento periodontal submetidas à associação de antibióticos e fibrina rica em plaquetas injetável.

Os objetivos específicos foram:

Avaliar, a partir dos ensaios biológicos *in vitro*, a citotoxicidade, conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina, e formação e quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização, das células mesenquimais do ligamento periodontal expostas ao meio de cultura contendo o i-PRF e diferentes concentrações de amoxicilina e metronidazol.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto trata-se de um estudo experimental *in vitro*. O protocolo para manipulação de tecidos humanos (sangue e dentes) foi inicialmente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do ICT UNESP de São José dos Campos (CEPH), sob o número do parecer n°: 4.217.367 para a obtenção do sangue, e parecer n°: (CAAE 84105024.8.0000.0077) para a obtenção de células do ligamento periodontal a partir de terceiros molares extraídos.

Com a aprovação da justificativa de reformulação do projeto de pesquisa, a nova metodologia proposta previa a avaliação dos ensaios biológicos *in vitro* de proliferação celular, citotoxicidade, genotoxicidade, conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina, e formação de nódulos de mineralização, das células mesenquimais do ligamento periodontal expostas ao meio de cultura associado ao i-PRF e concentrações de amoxicilina. No entanto, devido à impossibilidade de utilização do microscópio de fluorescência devido a um problema técnico, não foi possível avaliar a proliferação celular e a genotoxicidade. No entanto, foram acrescentados outros dois grupos teste de avaliação, com diferentes concentrações de metronidazol.

Os procedimentos *in vitro* foram desenvolvidos no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) e no Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais (CEBAPE), localizados do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do ICT CSJC – UNESP.

Delineamento experimental *in vitro*

Os experimentos foram realizados nos períodos determinados e descritos em cada análise, após o plaqueamento PDLSCs em microplacas de cultura celular.

Para as avaliações *in vitro*, as células PDLSCs foram divididas em quatro grupos experimentais:

- Grupo controle (C): PDLSCs em meio de cultura completo (α -MEM, soro fetal bovino e antibióticos) com dexametasona a 100 milimolar (mM) (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 180 mM;

- Grupo Amoxicilina 5 mg/mL (A_5): PDLSCs em meio de cultura completo com 5 mg/mL de Amoxicilina, dexametasona a 100 mM (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de hidróxido de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 180 mM, acrescentados à solução de i-PRF a 20%;

- Grupo Amoxicilina 10 mg/mL (A_{10}): PDLSCs em meio de cultura completo com 10 mg/mL de Amoxicilina, dexametasona a 100 mM (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA,

Darmstadt, Alemanha), de hidróxido de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 180 mM, acrescentados à solução de i-PRF a 20%;

- Grupo i-PRF 20% (I): PDLSCs em meio de cultura completo com 20% de i-PRF (descrito detalhadamente a seguir), com dexametasona a 100 mM (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), e hidróxido de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 180 mM;

- Grupo Metronidazol 5 mg/mL (M_5): PDLSCs em meio de cultura completo com 5 mg/mL de Metronidazol, dexametasona a 100 mM (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de hidróxido de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 180 mM, acrescentados à solução de i-PRF a 20%;

- Grupo Metronidazol 10 mg/mL (M_{10}): PDLSCs em meio de cultura completo com 10 mg/mL de Amoxicilina, dexametasona a 100 mM (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de hidróxido de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 180 mM, acrescentados à solução de i-PRF a 20%.

A escolha das concentrações dos antibióticos foi baseada nos resultados obtidos a partir do estudo “Utilização da fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) como sistema de liberação de antimicrobianos” realizado no grupo de pesquisa do ICT CSJC UNESP.

Preparo do i-PRF e do meio de cultura enriquecido com i-PRF

A coleta de sangue foi realizada por um Cirurgião-Dentista treinado, integrante da equipe, para o procedimento de venopunção à vácuo. Inicialmente foram identificadas as veias superficiais na região da fossa antecubital dos braços dos pacientes doadores. Cada paciente doará 100 mL de sangue venoso que serão coletados seis tubos de 10 mL de sangue. A cada 10 mL de sangue venoso coletado, 1 mL de i-PRF é adquirido (Miron et al., 2017). Desta forma, serão obtidos no total 60 mL de i-PRF que serão utilizados no preparo do meio de cultura enriquecido com i-PRF dos experimentos.

Os tubos plásticos estéreis (Vacuette®, Greiner Bio-One Brasil Ltda, Americana, São Paulo, Brasil) com as amostras de sangue coletados foram submetidos à centrifugação (Horizontal PRF Centrifuge Machine, Bio-PRF®, Estados Unidos) de 700 rpm (rotações por minuto) por 3 minutos, à temperatura ambiente. O i-PRF obtido em cada tubo será removido do sangue centrifugado com auxílio de uma agulha longa, sendo o bisel o ponto de referência (Thanasrisuebwong et al. 2020).

O i-PRF coletado de cada tubo foi disposto em microplacas de cultivo celular de 24 poços (CELLSTAR® Greiner Bio-One Brasil Ltda, Americana, São Paulo, Brasil) e incubado por 30 minutos em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C, para que permanecesse coagulado. Em seguida, foram acrescentados ao i-PRF coagulado, 1 mL de meio de cultura α -MEM (Gibco® - Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, Estados Unidos) aos poços

que foram mantidos em estufa com 5% de CO₂, a 37°C, por 72 horas.

Após este período, o meio de cada poço foi aspirado e armazenado em tubos de microcentrifuga (Sigma - Aldrich®, Estados Unidos) a -20°C, para compor o meio de cultura enriquecido com i-PRF que foi utilizado nos experimentos.

O meio de cultura enriquecido com i-PRF foi composto por 20% α-MEM com i-PRF, 65% de α-MEM suplementado com antibióticos (Gibco® - Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, Estados Unidos) e 15 % de soro fetal bovino (Cultilab® LTDA - Campinas, SP, Brasil), conforme descrito previamente em Thanasrisuebwong et al. (2020).

Plaqueamento das células mesenquimais do ligamento periodontal (PDLSCs)

As células do ligamento periodontal foram plaqueadas em microplacas de 24 poços (Kasvi®, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) após atingirem a confluência de 80% do frasco de cultivo celular. Para isso, o meio de cultura foi removido, o frasco lavado com 5 mL de solução tampão PBS, e adicionados 3 mL de tripsina - ácido etilenodiaminotetraacético a 0,25% (Gibco® - Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, Estados Unidos). O frasco de cultivo celular foi levado para a estufa de 5% CO₂, a 37°C, por 5 minutos. Após a conferência do desprendimento das células da garrafa, por meio de avaliação em microscópio, foram adicionados ao frasco 6 mL de meio de cultura completo para inativar a tripsina, e o conteúdo foi colocado em tubo de centrifuga cônico de 15 mL (TTP®, Biosystems, Curitiba, PR, Brasil) e levado à centrifuga a 1200 rpm por 5 minutos (Centrifuga Labnet - HERMLE Z 300K, NJ, Estados Unidos).

O sobrenadante após a centrifugação foi descartado, e o precipitado celular formado foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura completo. Para a contagem de células nos poços, foram coletados 5 µL de células ressuspensionadas e colocadas em um tubo de microcentrifuga (Sigma - Aldrich®, Estados Unidos) com 45 µL de azul de tripan (Sigma - Aldrich®, Estados Unidos). Desta solução, 10 µL foram levados para a câmara de Neubauer para a visualização e contagem dos quadrantes com células por meio de microscopia de luz de fase invertida (Carl Zeiss® Microlimaging GmbH - Axiovert 40C, Alemanha). Foi calculada e obtida a média de células/poço, sendo que a quantidade de células dispensadas será de 2×10^5 células/poço, na placa de 24 poços, em duplicata técnica. Para os experimentos *in vitro*, foram utilizadas células nas passagens de 4 a 6.

As células nas microplacas de 24 poços receberam inicialmente o meio completo, que permaneceu por 24 horas após o plaqueamento. Após esse período, as células receberam o meio de cultura de acordo com o grupo experimental (GC, A₅, A₁₀, G_i, M₅ e M₁₀), e prosseguiram para os testes estabelecidos.

Viabilidade celular (citotoxicidade)

A determinação da viabilidade celular foi realizada em 07 dias de cultura celular de acordo com cada grupo experimental. Para isso, as células foram submetidas à avaliação quantitativa de células vivas após a exposição e incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)] (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Alíquotas de MTT a 0.5 mg/mL em solução de PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução por 4 horas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e adicionados 500 µL da solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide Gibco® - Life Technologies, Baltimore, Estados Unidos) que permaneceu nos poços por 10 minutos em estufa de CO₂, a 37°C. Em seguida, as microplacas de cada grupo experimental foram colocadas sob agitação por 10 minutos para solubilização completa do precipitado formado. Três alíquotas de 100 µL foram retiradas de cada um dos poços e transferidas para placa de 96 poços (CELLSTAR®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek® EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos) do MIB do ICT CSJC - UNESP. Os dados foram aferidos como absorbância e convertidos para porcentagem, sendo o grupo controle considerado 100%.

Avaliação da atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total

A avaliação da atividade da fosfatase alcalina e do conteúdo de proteína total foram determinados após 10 dias de cultura celular.

O teste foi realizado com o kit Fosfatase Alcalina referência 40 (Labtest Diagnóstica® S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e os procedimentos conduzidos de acordo com as especificações do fabricante. Após a remoção do meio de cultura de cada placa dos grupos experimentais, os poços foram lavados três vezes com solução tampão PBS, e preenchidos com 150 µL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), para extração das proteínas. Foram preparadas duas placas de 96 poços para condicionar as amostras referentes a cada poço da placa de 24 poços dos testes de fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total. Após 30 minutos, alíquotas de 5 µL foram distribuídas dos poços para a placa de 96 poços da fosfatase alcalina e aplicadas as soluções de acordo com o protocolo do fabricante. Na placa de 96 poços da proteína, além dos 5 µL de células de cada poço, foram acrescentados 50 µL da solução de Lowry (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 50 µL de Folin e Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em cada poço. A

absorbância de 590 nm para a fosfatase alcalina e 680 nm para a proteína foram avaliadas em espectrofotômetro (Biotek® EL808IU, Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos), no LEIC do ICT CSJC - UNESP.

Quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização

A formação e quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização de cada grupo experimental serão avaliadas aos 14 dias de cultura celular. Para tanto, as células aderidas ao poço da placa foram fixadas em solução de formol a 10% por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas com uma série gradual de álcool e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 40 mM, pH 4,2, por 30 minutos.

Para a quantificação do cálcio presente nas formações mineralizadas serão acrescentados 500 µL de ácido acético (10%), por 30 minutos, em agitação suave. Após este período serão acrescentados 500 µL de hidróxido de amônio (10%) em cada poço e incubação sob agitação, para neutralizar o ácido acético. Alíquotas de 200 µL de cada poço serão transferidas para a placa de 96 poços (CELLSTAR®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) para a leitura em micro leitor de placa (Biotek® EL808IU, Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos), em comprimento de onda de 405 nm, no LEIC do ICT CSJC - UNESP.

Análise estatística

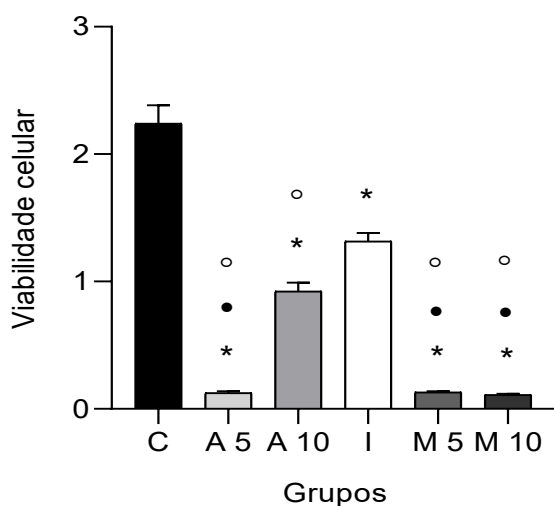
Os dados obtidos em cada análise foram tabulados e submetidos à análise estatística. Inicialmente foi verificada a normalidade e igualdade de variâncias e, para a avaliação da viabilidade celular o teste estatístico aplicado foi ANOVA 1 fator. Para a avaliação da atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total e quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para todos os testes, o nível de significância foi de 5 %.

RESULTADOS

Viabilidade celular (citotoxicidade)

Após 7 dias de cultura celular, os grupos experimentais foram submetidos ao teste de viabilidade celular.

Figura 1 – Gráfico representativo da comparação intergrupos da viabilidade celular (citotoxicidade)



Legenda: ANOVA 1-fator e pós teste Tukey. Comparação intergrupos. Diferença estatística entre os grupos comparado ao Controle (*), ao grupo A₁₀ (•) e ao grupo I (°), $p < 0.05$.

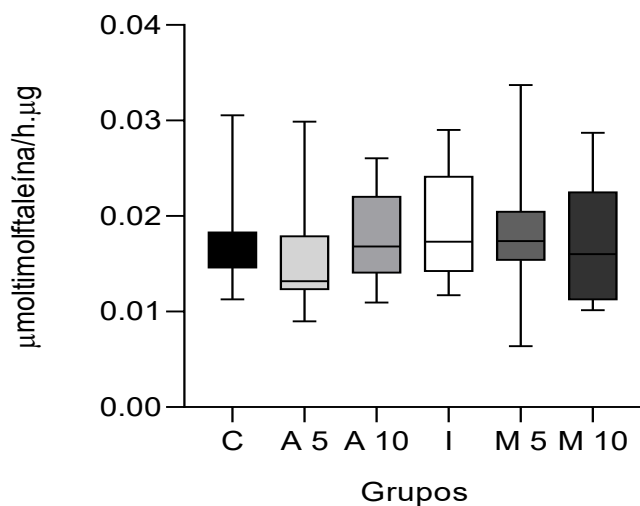
Após a exposição das células ao agente citotóxico MTT, a viabilidade celular foi mensurada a partir da densidade óptica de cada poço da placa. A análise dos dados revelou que, para o grupo A₁₀, a viabilidade celular foi maior em comparação ao grupo A₅, e aos grupos com metronidazol M₅ e M₁₀ ($p < 0.0001$).

Para o grupo I, a viabilidade celular foi maior em comparação aos grupos com antibióticos em diferentes concentrações ($p < 0.0001$).

Avaliação da atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total

Após 10 dias de cultura celular, foram avaliados a atividade da fosfatase alcalina e o conteúdo de proteína total.

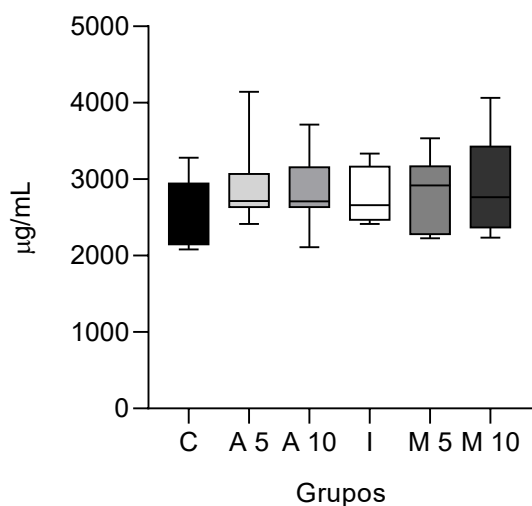
Figura 2 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da atividade da fosfatase alcalina



Legenda: Kruskal-Wallis e pós teste Dunn. Comparação intergrupos, $p < 0.05$.

Os dados obtidos a partir da análise da atividade da fosfatase alcalina revelaram que não houve diferença estatística significativa para a expressão de fosfatase alcalina (Figura 2).

Figura 3 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do conteúdo de proteína total



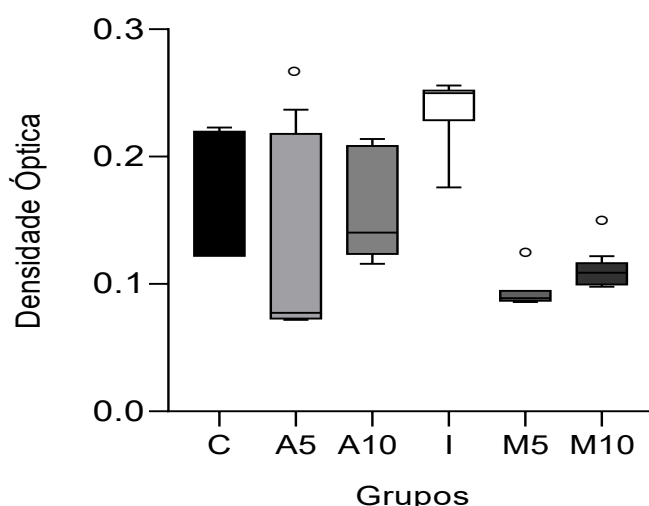
Legenda: Kruskal-Wallis e pós teste Dunn. Comparação intergrupos, $p < 0.05$.

Assim como para a atividade da fosfatase alcalina, não houve diferenças intergrupos em relação à quantidade de proteína total entre os grupos (Figura 3).

Quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização

No 14º dia de cultura celular foi realizada a avaliação da quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização.

Figura 4 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da quantidade de cálcio presente nos nódulos de mineralização



Legenda: Kruskal-Wallis e pós teste Dunn. Comparação intergrupos. Diferença estatística entre os grupos comparado ao grupo I (°), $p < 0.05$.

A quantidade de cálcio presente nos nódulos de mineralização foi estatisticamente maior para o grupo I em comparação aos grupos A₅ ($p = 0.0075$), M₅ ($p = 0.0006$) e ao M₁₀ ($p = 0.0321$), representados na Figura 4.

DISCUSSÃO

O foco atual de pesquisas em Periodontia tem envolvido o desenvolvimento e aplicação de tecnologias inovadoras baseadas em células, estruturas bioativas e biomiméticas (Liu et al., 2019, Farshidfar et al., 2022). Isso se deve ao fato de que as abordagens convencionais para o tratamento de doenças periodontais podem não promover uma resposta clínica satisfatória para o tratamento. Dessa forma, a utilização de antibióticos adjuvantes pode proporcionar benefícios clínicos adicionais em grupos de pacientes não-responsivos (Szulc et al., 2018; Cosgarea et al., 2021).

Os agentes antimicrobianos podem ser administrados tanto sistêmica quanto localmente (Jepsen et al., 2018), sendo que nessa forma algumas importantes vantagens foram relatadas, como a alta concentração do medicamento na região-alvo, redução dos

efeitos colaterais e do risco de resistência bacteriana (Joshi et al., 2016) e proporcionando resultados positivos para o tratamento da periodontite (Szulc et al., 2018).

Uma das maneiras para a aplicação local dos antimicrobianos é a utilização da fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF). Por ser um biomaterial inteiramente autólogo apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade, liberação contínua e lenta de fatores de crescimento derivados do sangue em sua composição (Wang et al., 2016; Choukroun et al., 2018; Dohle et al., 2018), como o fator de crescimento de fibroblastos (FGFs), endotelial vascular (VEGFs), transformadores (TGFs) e fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs). Esses fatores desempenham importante papel nas fases iniciais da cicatrização, atuando sinergicamente no local da ferida, e favorecendo o reparo tecidual (Choukroun et al., 2018; Dohle et al., 2018; Duan et al., 2018; Thetay et al., 2021). Além disso, foi constatada sua capacidade de liberação em longo prazo de fatores de crescimento (Miron et al., 2017) e de redução do processo inflamatório local induzido por lipopolissacarídeos bacterianos (Miron et al., 2023).

Considerando a necessidade de entendimento da interação das células mesenquimais derivadas do ligamento periodontal (PDLSCs) ao i-PRF associado aos antimicrobianos, os resultados observados na avaliação da viabilidade celular após a exposição ao MTT, o grupo I apresentou maior quantidade de células viáveis em comparação aos grupos submetidos à associação do i-PRF aos antibióticos. Dentre os grupos com antimicrobianos, no grupo Amoxicilina 10 mg/mL (A₁₀) a viabilidade celular foi maior em comparação com o grupo A₅ e aos grupos com diferentes concentrações de metronidazol. Apesar da redução da viabilidade celular observada na associação do i-PRF aos antibióticos, especialmente com o metronidazol, a concentração de A₁₀ apresentou resultados superiores comparado ao A₅. Esse achado pode ser atribuído a diferenças na interação físico-química entre a amoxicilina e o i-PRF, favorecendo o grupo com maior concentração do medicamento.

Para a avaliação da produção de fosfatase alcalina, importante proteína extracelular marcadora da diferenciação osteoblástica, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. A ausência de diferença entre os grupos pode ser devido ao tempo reduzido de cultura adotado (10 dias).

O estágio final após a diferenciação celular osteoblástica é a mineralização da matriz extracelular. A capacidade de diferenciação dessas células pode ser identificada pela deposição de íons cálcio revelados por meio da alizarina. Nos resultados referentes à quantificação de cálcio observamos que o grupo I apresentou índices maiores em comparação aos demais grupos, inclusive ao controle. Esse fenômeno pode ser justificado pela presença abundante de fatores de crescimento no i-PRF, os quais favorecem a osteogênese e a mineralização pelas células mesenquimais do ligamento periodontal. Além disso, pode-se inferir que a ausência de antibióticos preserva a atividade metabólica plena

das células mesenquimais potencializando a quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização.

Em relação aos antibióticos e os resultados dos testes apresentados observamos que o metronidazol, em ambas as concentrações, apresentou um desempenho inferior a amoxicilina, especialmente a A10. Essas observações também foram constatadas no monitoramento do desenvolvimento da cultura celular. No entanto, devido à ausência de outros testes complementares, como a proliferação celular e a genotoxicidade, bem como de modelos experimentais semelhantes na literatura, não é possível elaborar conclusões assertivas. A utilização dessas concentrações foi estabelecida a partir de um estudo *in vitro* que determinou as concentrações inibitórias para os principais patógenos periodontais.

CONCLUSÃO

Considerando as limitações do presente estudo, podemos concluir que o i-PRF proporcionou benefícios para a cultura celular, principalmente em relação à presença de maior quantidade de nódulos de mineralização e na viabilidade celular, sendo um material promissor para a Odontologia. Além disso, novas concentrações dos antibióticos deverão ser pesquisadas e estabelecidas para que futuras avaliações *in vitro* sejam realizadas em busca de um sistema eficaz de liberação de antimicrobianos locais para o tratamento de doenças periodontais.

Conflito de interesses

Não há conflito de interesses na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

Abd El Raouf M, Wang X, Miusi S, Chai J, Mohamed AbdEl-Aal AB, Nefissa Helmy MM, Ghanaati S, Choukroun J, Choukroun E, Zhang Y, Miron RJ. Injectable platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. *Platelets*. 2019;30(2):213-221. doi: 10.1080/09537104.2017.1401058.

Avila-Ortiz G, De Buitrago JG, Reddy MS. Periodontal regeneration - furcation defects: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015 Feb;86(2 Suppl):S108-30. doi: 10.1902/jop.2015.130677.

Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie* 2001; 42: 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.012>

Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:56-60.

Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells and platelets: first introduction of the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017;44:87–95.

Cosgarea R, Eick S, Batori-Andronescu I, Jepsen S, Arweiler NB, Rößler R, et al. Clinical and microbiological evaluation of local doxycycline and antimicrobial photodynamic therapy during supportive periodontal therapy: A randomized clinical trial. *Antibiotics*. 2021;10(3):1–12. doi: 10.3390/antibiotics10030277.

de Lima Barbosa R, Stellet Lourenço E, de Azevedo Dos Santos JV, Rodrigues Santiago Rocha N, Mourão CF, Alves GG. The Effects of Platelet-Rich Fibrin in the Behavior of Mineralizing Cells Related to Bone Tissue Regeneration-A Scoping Review of In Vitro Evidence. *J Funct Biomater*. 2023 Oct 9;14(10):503. doi: 10.3390/jfb14100503.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:e37–44.

Duan X, Lin Z, Lin X, Wang Z, Wu Y, Ji M, Lu W, Wang X, Zhang D. Study of platelet-rich fibrin combined with rat periodontal ligament stem cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Mol Med*. 2018 Feb;22(2):1047-1055. doi: 10.1111/jcmm.13461.

Esmailnejad A, Talebi Ardakani M, Shokri M, Nima Hosseini Khou P, Kamani M. Comparative Evaluation of the Effect of Two Platelet Concentrates (a-PRF and L-PRF) on the Cellular Activity of Pre-osteoblastic MG-63 Cell Line: An in vitro Study. *J Dent (Shiraz)*. 2023 Jun;24(2):235-244. doi: 10.30476/dentjods.2022.93305.1709.

Farshidfar N, Jafarpour D, Firoozi P, Sahmeddini S, Hamedani S, de Souza RF, Tayebi L. The application of injectable platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic scoping review of In vitro and In vivo studies. *Jpn Dent Sci Rev*. 2022 Nov; 58:89-123. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.02.003.

Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;67:131-86. <https://doi.org/10.1111/prd.12075>

Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv*. 2016;23(2):363–77. doi: 10.3109/10717544.2014.935531.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 22; 3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.

Knafl D, Thalhammer F, Vossen MG. In-vitro release pharmacokinetics of amikacin, teicoplanin and polyhexanide in a platelet rich fibrin-layer (PRF)-a laboratory evaluation of a modern, autologous wound treatment. *PLoS One*. 2017 Jul 7;12(7):e0181090. doi: 10.1371/journal.pone.0181090.

Könönen E, Gursoy M, Gursoy UK. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J Clin Med*. 2019 Jul 31;8(8):1135. doi: 10.3390/jcm8081135.

Kumar RV, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration. *Cell Tissue Bank*. 2013 Sep;14(3):453-63. doi: 10.1007/s10561-012-9349-6.

Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, Oates TW, Chang X, Xu HHK. Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*. 2019 Jun 4;8(6):537. doi: 10.3390/cells8060537.

Mendoza AH, Balzarini D, Alves T, Holzhausen M, Rovai ES. Potential of Mesenchymal Stem Cell Sheets on Periodontal Regeneration: A Systematic Review of Pre-Clinical Studies. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2023;18(7):958-978. doi: 10.2174/1574888X17666220706092520.

Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Feb;23(1):83-99. doi:10.1089/ten.TEB.2016.0233.

Miron RJ, Zhang Y. Autologous liquid platelet-rich fibrin: a novel delivery drug delivery system. *Acta Biomaterialia*. 2018;75:35–5.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1: S173-S182.

Polak D, Clemer-Shamai N, Shapira L. Incorporating antibiotics into platelet-rich fibrin: A novel antibiotics slow-release biological device. *J Clin Periodontol*. 2019 Feb;46(2):241-247. doi: 10.1111/jcpe.13063.

Queiroz A, Albuquerque-Souza E, Gasparoni LM, de França BN, Pelissari C, Trierveiler M, Holzhausen M. Therapeutic potential of periodontal ligament stem cells. *World J Stem Cells*. 2021 Jun 26;13(6):605-618. doi: 10.4252/wjsc. v13.i6.605.

Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000*. 1996;10:139-59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1996.tb00072.x>.

Shanbhag S, Stavropoulos A, Suliman S, Hervig T, Mustafa K. Efficacy of Humanized Mesenchymal Stem Cell Cultures for Bone Tissue Engineering: A Systematic Review with a Focus on Platelet Derivatives. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Dec;23(6):552-569. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0093.

Szulc M, Zakrzewska A, Zborowski J. Local drug delivery in periodontitis treatment: A review of contemporary literature. *Dent Med Probl*. 2018;55(3):333–42. doi: 10.17219/DMP/94890.

Thanasrisuebwong P, Kiattavorncharoen S, Surarit R, Phruksaniyom C, Ruangsawasdi N. Red and Yellow Injectable Platelet-Rich Fibrin Demonstrated Differential Effects on Periodontal Ligament Stem Cell Proliferation, Migration, and Osteogenic Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 21;21(14):5153. doi: 10.3390/ijms21145153.

Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, Paganelli A, Diomedea F. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev*. 2019 Aug 1;28(15):995-1003. doi: 10.1089/scd.2019.0025.

Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, Bai SZ, Dong Y, Chen FM, Zhao YM. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering. *Sci Rep*. 2016 Jun 21; 6:28126. doi: 10.1038/srep28126.