

HECTOR VALENTIN CABALLERO FLORES

**Desenvolvimento e caracterização de matrizes tridimensionais porosas
a base de quitosana, gelatina e dentina em pó para aplicação
em endodontia regenerativa**

São Paulo

2019

HECTOR VALENTIN CABALLERO FLORES

**Desenvolvimento e caracterização de matrizes tridimensionais porosas
a base de quitosana, gelatina e dentina em pó para aplicação
em endodontia regenerativa**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Dentística) para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

São Paulo

2019

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

Caballero Flores, Hector Valentin.

Desenvolvimento e caracterização de matrizes tridimensionais porosas a base de quitosana, gelatina e dentina em pó para aplicação em endodontia regenerativa / Hector Valentin Caballero Flores ; orientador Manoel Eduardo de Lima Machado - São Paulo, 2019.

136 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia. – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Matrizes sólidas. 2. Quitosana. 3. Genipina. 4. Gelatina. 5. Dentina em pó. I. Machado, Manoel Eduardo de Lima. II. Título.

Caballero-Flores HV. Desenvolvimento e caracterização de matrizes tridimensionais porosas a base de quitosana, gelatina e dentina em pó para aplicação em endodontia regenerativa. Tese apresentada à Faculdade da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 20/08/2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Hair Salas Beltran

Instituição: FO – UCSM

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Cleber Keiti Nabeshima

Instituição: FO - UNICSUL

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Marcia Martins Marques

Instituição: FO - USP

Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que concede a vida, saúde e oportunidades.

A **Nossa Senhora**, nos seus títulos de **Nossa Senhora Aparecida** e **Nossa Senhora de Guadalupe**, tenho certeza que Você sempre está no meu lado cuidando-me e que intercedeu para que eu possa cumprir meu sonho de poder estudar no Brasil.

A meus pais, **Hector e Socorro**, quem sempre me apoiaram e fizeram de tudo para eu poder estar aqui incentivando-me sempre a seguir neste caminho, vocês são meus maiores exemplos de perseverança.

A meu amor, **Mônica**, estes quatro anos que estamos juntos coincidiram com o tempo do meu doutorado, você fez este tempo mais leve e me deu força quando mais precisei, não posso imaginar como teria sido sem você ao meu lado, obrigado por tudo, esta conquista também é sua.

A minha irmã, **Alle Alexandra**, sempre a meu lado ajudando-me, obrigado por tudo o que o que você faz por mim.

A minha avó, **Ofelia**, hoje não estas aqui mas sei que desde o céu você me acompanha e comparte está alegria, você sempre será meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Eis aqui a conclusão desta etapa da minha formação acadêmica que começou lá no 2015, aqui estão resumidos em quase trinta e três mil palavras o trabalho de mil quatrocentos e sessenta dias, longos dias no laboratório e à frente do computador. Este trabalho não poderia ter sido concluído sem a confiança, apoio e amizade de diversas pessoas. As palavras aqui escritas não conseguem refletir o meu agradecimento para com todos vocês, que de maneira direta ou indireta contribuíram com o presente trabalho e com minha formação acadêmica e pessoal.

Ao, **Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado**, pelo apoio oferecido desde antes que chegasse ao Brasil. Muito obrigado por todos os ensinamentos e a confiança nestes anos de doutorado. É todo um privilegio ser orientado por um dos maiores nomes da endodontia contemporânea. Aprendi muito nestes anos. Muito obrigado Professor.

Ao **Cleber Nabeshima**, grande amigo deste caminho da ciência, obrigado mesmo por sua parceria. As horas de trabalho no laboratório da microbiologia sempre serviram para discutir de diferentes tópicos endodônticos, e sempre surgiam novos projetos. Tenho certeza que ainda temos muitos projetos para desenvolver.

À **Profa. Dra. Marcia Martins Márquez**, grande pesquisadora aprendi muito com a Sra. e com sua equipe, em especial com **Stella** e **Ana Clara**. Sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo. Muito obrigado.

À **Profa. Dra. Silvana Cai**, foi toda uma honra poder aprender de microbiologia com a Sra., sempre gentil e disposta a resolver minhas dúvidas. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Vitor Arana-Chavez**, muito obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório para realizar este e outros trabalhos paralelos. Seu amplo conhecimento sobre histologia e microscopia contribuíram grandemente na minha formação.

Ao **Prof. Dr. Hair Salas-Beltran**, grande mestre e amigo desde a época da minha graduação, lá na Universidade Católica de Santa Maria. Muito obrigado por todo o apoio e incentivo destes anos, sempre me lembrando que a ciência não pode ser pragmática e que alguns dogmas podem ser mudados com base na evidencia científica e na observação clínica.

Aos amigos da equipe, **Alexander Zolio, Thais Nejm, Giovanna Sarra, Kareen Sepulveda e Raquel Guillem**, muito obrigado pelo companheirismo, pela amizade e pela ajuda, sempre podem contar comigo.

Ao **Douglas** e a **Elis**, muito obrigado pela ajuda e pela parceria. O laboratório da Biologia Oral não seria o mesmo sem vocês.

Aos amigos da equipe do curso de especialização da APCD, especialmente a **Profa. Marcia** e a **Profa. Regina**, obrigado aprendi e aprendo muito com vocês.

Aos professores das diferentes disciplinas que cursei, obrigado por ter contribuído na minha formação acadêmica.

*“Vive como si fueras a morir mañana,
Aprende como si fueras a vivir para siempre”*

San Isidoro de Sevilla

RESUMO

Caballero-Flores HV. Desenvolvimento e caracterização de matrizes tridimensionais porosas a base de quitosana, gelatina e dentina em pó para aplicação em endodontia regenerativa [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

A composição e arquitetura das matrizes desempenham um papel importante na regeneração tecidual, e a interação entre seus componentes pode influenciar no desenvolvimento celular. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e analisar as características morfológicas, físico-químicas, biológicas e antimicrobianas de matrizes reticuladas ou não a base de quitosana, gelatina e dentina em pó. Matrizes sólidas de quitosana pura; quitosana e gelatina reticuladas ou não com genipina; quitosana, gelatina e dentina em pó reticuladas ou não, foram elaboradas através do método de congelamento e liofilização. As características morfológicas das matrizes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. As características físico-químicas foram analisadas ensaio de degradação, embebição e liberação de proteínas. A citotoxicidade do meio condicionado com as matrizes nas células-tronco da papila dental foi avaliada pelo ensaio de MTT. A citotoxicidade das matrizes foi avaliada pelo ensaio de contato direto. A morfologia e adesão celular nas matrizes foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e a proliferação celular pelo ensaio de MTT. A diferenciação das células nas matrizes foi avaliada pelo ensaio de vermelho de alizarina. O efeito antimicrobiano das matrizes foi avaliado pelo método de cultura bactéria, e a adesão das bactérias nas matrizes foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Os dados obtidos foram comparados com nível de significância de 5%. Assim, todas as matrizes apresentaram estruturas porosas. A reticulação da matriz reduziu a taxa de degradação e embebição. Com exceção da quitosana pura, todas as matrizes liberaram proteínas. A adição de dentina em pó nas matrizes reticuladas compostas por quitosana e gelatina promoveu maior liberação de proteínas, adesão, proliferação e diferenciação celular. Adicionalmente, conferiu-lhe efeito bacteriostático sobre *E. faecalis*, limitando sua adesão à superfície da matriz. Assim, conclui-se que a matriz reticulada composta por quitosana e gelatina com adição de dentina em pó apresenta características morfológicas, físico-químicas,

biológicas e antimicrobianas adequadas para seu potencial emprego na regeneração das estruturas do complexo dentinho-pulpar. Sendo a adição de dentina em pó determinante na melhoria dessas características.

Palavras-chave: Matrizes sólidas. Quitosana. Genipina. Gelatina. Dentina em pó.

ABSTRACT

Caballero-Flores HV. Development and characterization of three-dimensional porous chitosan, gelatin and dentin powder scaffolds for regenerative endodontics [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

The composition and architecture of the scaffolds play an important role in the tissue regeneration, and the interaction between its components can influence the cellular development. Thus, the aim of this study was to develop and analyze the morphological, physicochemical, biological and antimicrobial properties of chitosan-based scaffold associated to gelatin and dentin powder. Solid scaffolds of chitosan-based only; chitosan-based scaffold associated to gelatin cross-linked or not by genipina; chitosan-based associated to gelatin and dentin powder cross-linked or not by genipin, were prepared by the freeze-drying method. The morphology of the scaffolds was analyzed by scanning electron microscopy. The physico-chemical properties were analyzed for degradation, imbibition and release of proteins. The cytotoxicity of the conditioned medium by scaffolds on the stem cells of the dental papilla was evaluated by the MTT assay. The cytotoxicity of the scaffolds was evaluated by direct contact assay. The cell morphology and adhesion on the scaffolds were evaluated by scanning electron microscopy, and cell proliferation by the MTT assay. Cell differentiation on the scaffolds was assessed by the alizarin red assay. The antimicrobial effect of the scaffolds was evaluated by the bacterial culture method, and the adhesion of the bacteria to the scaffolds was observed by scanning electron microscopy. The data obtained were statistically compared at significance level of 5%. All the scaffolds had porous structures. The crosslinking of the scaffolds reduced the degradation and swelling ratio. With the exception of scaffold chitosan-based only, all scaffolds released proteins. The addition of dentin powder in the crosslinked scaffolds of chitosan-based associated to gelatin promoted greater protein release, adhesion, proliferation and cell differentiation. In addition, it resulted to bacteriostatic effect on *E. faecalis*, limiting its adhesion to the scaffold surface. Thus, it is concluded that the chitosan-based scaffold associated to gelatin and dentin powder cross-linked by genipina has morphological, physico-chemical, biological and antimicrobial properties

suitable for its potential use in the endodontic regeneration, and the dentin powder is important for the improvement of these properties.

Keywords: Solid matrix. Chitosan. Genipin. Gelatin. Dentin powder.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/ml}$	microgramas por mililitro
μl	microlitro
μm	micrômetro
ALP	fosfatase alcalina
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BMP-7	proteína da matriz óssea 7
BSP	sialoproteína óssea
Col-1	colágeno tipo 1
DMP-1	proteína de matriz dentinária 1
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP-MSC	célula-tronco mesenquimal da polpa dental
DPSC	célula-tronco da polpa dental
DSP	sialoproteína dentinária
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EGFR-1	receptor do fator de crescimento epidérmico-1
EGTA	ácido aminopolicarboxílico
ELISA	ensaio imuno-sorbente ligado a enzima
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
FGF-2	fator de crescimento de fibroblastos-2
FGF-7	fator de crescimento de fibroblastos-7
GDF-15	fator de crescimento/diferenciação 15
HGF	fator de Crescimento do Hepatócito
HUVEC	células endoteliais da veia umbilical humana
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina-1
IGFBP-2	proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 2

INS	insulina
ISO	International Standard Organization
M	molaridade
MEPE	fosfoglicoproteína extracelular da matriz óssea
mg/ml	miligrama por mililitro
ml	mililitro
mM	massa molecular
mmol/l	milimol por litro
mols/l	moles por litro de solução
MTA	agregado trióxido mineral
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
ng/μg	nanograma por micrograma
NGF	fator de crescimento nervoso
NGFR	superfamília do receptor do fator de necrose tumoral-16
NHS	N-Hidroxisuccinimida
OCN	osteocalcina
OM	osteonectina
p/v	peso do soluto/ volume da solução
PBS	tampão fosfato salino
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGF-AA	subunidade do fator de crescimento derivado de plaquetas - A
PDGF-AB	fator de crescimento derivado de plaquetas
pg/ml	picograma por mililitro
PIGF	fator de crescimento da placenta
RGD	arginina - glicina - ácido aspártico
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RUNX2	fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SCAP	células-tronco da papila dental
SCR-R	receptor do fator de crescimento de mastócitos / células-tronco
SFB	fluido humano simulado
SGF/IGF-2	fator de crescimento esquelético / fator de crescimento semelhante à insulina -2

SHED	célula-tronco da polpa de dente decíduo
TGF- β 1	fator de crescimento transformante β 1
UFC/ml	unidade formadora de colônia por mililitro
VEGF	fator de crescimento endotelial
VEGFR2	receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
3 PROPOSIÇÃO	65
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
5 RESULTADOS	87
6 DISCUSSÃO	107
7 CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICE	131
ANEXO	133

1 INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica regenerativa visa substituir as estruturas danificadas do complexo detino-pulpar através de diferentes procedimentos biológicos norteados pelos princípios da engenharia de tecidos. Assim, para que a regeneração dos tecidos aconteça, é necessária uma fonte apropriada de células-tronco para se diferenciar, fatores de crescimento que sinalizem a diferenciação celular, e matrizes que criem um microambiente favorável para a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular.

Dentro das características ideais das matrizes, sua biocompatibilidade é de suma importância, para assim, prevenir reações adversas nos tecidos circundantes, assim como a adequada biodegradação que permita a infiltração celular, a vascularização, a proliferação e a organização espacial das células, e eventualmente, a substituição da matriz pelos tecidos regenerados. Além disso, a composição, a arquitetura e o comportamento destas matrizes desempenham um papel crucial na capacidade de colonização celular. As matrizes tridimensionais, altamente porosas, favorecem o crescimento celular/tecidual e o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos. Transferindo este ecossistema ao canal radicular, a presença de bactérias residuais pode gerar uma influência negativa na regeneração tecidual, desta forma, é desejável que as matrizes tenham ação antimicrobiana para poder controlar essas bactérias e limitar seu efeito deletério. Até a presente data, não foi reportada nenhuma matriz que tenha todos os requisitos ideais para promover a regeneração das estruturas do complexo dentino-pulpar de maneira previsível e sistemática, o que faz necessário o estudo e desenvolvimento de novas matrizes que possam atingir esse objetivo.

Nesse sentido, a quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina, utilizada na engenharia de tecidos para a elaboração de matrizes biodegradáveis, biocompatíveis, não antigênicas, não tóxicas, biofuncionais e porosas, no qual apresenta uma estrutura similar aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular. No entanto, suas características químicas próprias não favorecem a adesão celular, tal característica se modifica quando a mesma é associada a outras substâncias como a gelatina e /ou através da sua reticulação. A gelatina é um

biomaterial obtido pela hidrólise parcial do colágeno, e comumente empregado na engenharia de tecidos pelas suas propriedades: ser altamente biodegradável, biocompatível e apresentar baixa imunogenicidade. Constituída pela sequência de aminoácidos: Arginina – Glicina – Ácido Aspártico, ela cria condições que podem colaborar com a adesão e migração celular. A reticulação, através do emprego de substâncias químicas naturais como a genipina, modifica as características físico-químicas das matrizes compostas de quitosana e gelatina, podendo contribuir para a obtenção de um substrato adequado para o desenvolvimento celular.

Por outro lado, a funcionalização das matrizes para controlar a diferenciação celular, é um desafio na endodontia regenerativa devido as variáveis envolvidas, como o desconhecimento da quantidade adequada de fatores de crescimento envolvidos no processo de regeneração. A dentina humana contém em seu interior vários fatores de crescimento fossilizados, tais como o TGF-B1, VEGF, BMP, FGF-2 e outras biomoléculas como peptídeos antimicrobianos, que podem ser extraídos da dentina e empregadas em prol da regeneração tecidual.

Assim, a elaboração de matrizes tridimensionas porosas, biocompatíveis, bioativas, antimicrobianas, com adequada taxa de biodegradação que favoreçam a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, e que sejam passíveis de ser levadas facilmente ao interior do canal radicular, devem ser analisadas com extrema propriedade na endodontia regenerativa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão dos assuntos relacionados ao presente estudo, a revisão da literatura foi dividida em quatro partes: na primeira, foram abordados o conceito, os componentes e as estratégias da endodontia regenerativa, em seguida, foram explorados temas relacionados às diferentes matrizes empregadas para a regeneração do complexo dentino-pulpar, na terceira parte, foram abordados temas relacionados às matrizes tridimensionais porosas a base de quitosana e suas combinações, e para finalizar, foram discorridos o assunto sobre a dentina na endodontia regenerativa.

2.1 ENDODONTIA REGENERATIVA

A neoformação de tecidos no interior do canal radicular como alternativa terapêutica ao tratamento endodôntico convencional tem sido anseio por muitas décadas, sendo Vidair e Butcher (1955) os primeiros em reportar a regeneração de tecido conjuntivo no interior do canal radicular em substituição à prática comum de remoção do tecido pulpar e preenchimento do canal radicular com material sintético. Segundo os autores, este tecido poderia aumentar a umidade do dente reduzindo sua fragilidade. Para este ensaio, a polpa de dentes de macacos foi removida, e os canais irrigados com formalina 10% após a instrumentação mecânica, sendo o terço cervical preenchido com guta-percha. Após 74 dias, observaram que o canal radicular estava invadido por tecido conjuntivo em 60% dos dentes. No entanto, a primeira tentativa de regenerar o tecido pulpar foi conduzida por Myers e Fountain (1974) que se propuseram avaliar se o preenchimento do canal radicular com coágulo de sangue associado ou não com gelatina resultaria na regeneração pulpar em dentes de macacos com periodontite apical e apicigênese completa ou não. Assim, após indução da patologia periapical, os dentes foram instrumentados e irrigados com hipoclorito de sódio 5%. Posteriormente, uma lima foi introduzida além do limite apical e o sangramento contido com cones de papel esterilizados. Após secagem do canal, os

dentes foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com a matriz empregada para o preenchimento do canal radicular, a saber: sangue coagulado do próprio animal *in situ* pela adição de trombina ou sangue do animal associado a pó de gelatina reabsorvível (Gelfoam). Como grupo controle, o canal foi preenchido com soro fisiológico ou deixado vazio. Posteriormente, os animais foram sacrificados de acordo com o tempo experimental de 2 semanas, 3 meses e 6 meses, e então, os dentes processados para análise histológica. Os autores observaram crescimento tecidual por invaginação no canal radicular com extensão entre 0,10 e 1 mm nos grupos experimentais, e que estava composto principalmente de tecido de granulação. Adicionalmente, os dentes com apicigênese completa apresentaram sinais de reabsorção radicular, enquanto que os dentes com apicigênese incompleta tiveram o processo de formação radicular contínuo com tentativas de fechamento apical por tecido osteóide/cementóide. Os autores concluíram que a regeneração ou o crescimento de tecido conjuntivo no interior do canal radicular de dentes de macaco previamente infectados não foi aumentado pelo sangue e/ou pelos substitutos do sangue.

A regeneração é um processo de reparação, no qual células lesadas são substituídas em número e arquitetura semelhante às do tecido original (Machado, 1992). Em geral, a engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências biológicas para desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função dos tecidos danificados ou perdidos (Langer; Vacanti, 1993). Neste assunto, a endodontia regenerativa foi definida por Murray et al. (2007) como procedimentos biológicos que visam substituir as estruturas danificadas do complexo dentino-pulpar através de estratégias terapêuticas baseadas na engenharia de tecidos, no qual é composto por três elementos, a saber: células-tronco, moléculas bioativas e “scaffolds/matriz. Nisto, a matriz permite o desenvolvimento do tecido; as células-tronco se diferenciam e criam o tecido; e as biomoléculas, como os fatores de crescimento, sinalizam as células a expressar o fenótipo tecidual desejado (Bonassar; Vacanti, 1998). Com o objetivo de estudar o papel de cada um desses componentes na regeneração endodôntica, Prescott et al. (2008) implantaram no dorso de ratos, terceiros molares humanos extraídos com perfuração simulada na furca, a qual foi preenchida de acordo com a divisão dos grupos, a saber: grupo 1 – MTA; grupo 2 – matriz de colágeno; grupo 3 –

matriz de colágeno impregnada com DMP-1; grupo 4 – matriz de colágeno impregnada com DMP-1 e DPSC; grupo 5 – matriz de colágeno inoculada com DPSC. Após 6 semanas, os animais foram sacrificados, e os implantes processados para coloração em hematoxilina e eosina, safranina-O, von Kossa e tricômio de Masson. Os autores reportaram que somente no grupo 4 foram observados sinais de regeneração tecidual na área da perfuração, caracterizado pela presença de células em proliferação morfológicamente semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos. Nos outros grupos, não foi possível observar tecido organizado. Assim, os autores concluíram que a associação dos três fatores da tríade da engenharia tecidual é fundamental para a regeneração das estruturas do complexo dentino-pulpar.

As estratégias terapêuticas propostas na regeneração endodôntica podem ser classificadas de acordo com a origem das células-tronco empregadas, que podem ser transplantadas ou recrutadas diretamente dos tecidos periapicais do indivíduo. No que se refere à abordagem do transplante celular, diante dos avanços da engenharia de tecidos na medicina, Langer e Vancati (1993) propuseram a terapia de transplante celular como uma nova abordagem com potencial para substituir tecidos perdidos ou disfuncionais como fígado, pâncreas, cartilagem, osso, músculo e vasos sanguíneos, e Monney et al. (1996) conduziram o primeiro estudo *in vitro* que mostrou o potencial dessa terapia na regeneração pulpar. Para isso, fibroblastos isolados da polpa dental humana foram semeados e cultivados sobre matrizes sintéticas a base de ácido poliglicólico. Após 60 dias de cultivo, os autores observaram através de microscopia eletrônica de varredura que as células semeadas se aderiram sobre as fibras da matriz, espalhando-se extensivamente sobre elas e proliferando-se entre seus espaços. Histologicamente, as matrizes se apresentaram altamente celularizadas. Assim, os autores sugeriram que a abordagem proposta poderia fornecer um novo tecido pulpar autólogo para substituir o tecido pulpar perdido. Contudo, ainda seria necessária a otimização do processo através do desenvolvimento de uma matriz adequada para o transplante celular, e a adição de liberação de fatores de crescimento para promover uma rede vascular e nervosa no tecido neoformado. Posteriormente, Huang et al. (2010) confirmaram *in vivo* a hipótese da regeneração no interior do canal radicular transplantando células numa matriz sintética sólida a base de ácido polilático e ácido poliglicólico. O crescimento celular das SCAP ou DPSC nas matrizes foi avaliado *in vitro* por eletromicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura

ou de luz. Para análise *in vivo*, as células foram semeadas sobre as matrizes e introduzidas no interior de dentes humanos, que foram implantados no dorso de ratos. Após 4 meses, os implantes foram processados para análise histológica e imunohistoquímica. Os autores observaram que, *in vitro*, tanto as SCAP como as DPSC aderiram-se e proliferaram-se na matriz. A análise *in vivo* do tecido neoformado no canal radicular apresentou características semelhantes com o tecido pulpar, porém, células semelhantes à odontoblastos só foram observadas em algumas regiões, predominando a presença de células não organizadas e não alinhadas. Adicionalmente, foi possível observar uma linha de dentina neoformada uniforme ao longo das paredes do canal, porém, sem apresentar túbulos dentinários organizados em sua maior extensão. Além disso, restos de matriz não reabsorvidos foram observados. Os autores concluíram que as células que puderam migrar através da matriz e chegaram às paredes dentinárias preexistentes diferenciaram-se em células semelhantes à odontoblastos. Contudo, essas células formaram dentina a ritmos diferentes, o que resultou na sua falta de organização, sendo necessário aprimorar os sinalizadores de diferenciação celular, assim como a taxa de degradação da matriz empregada, fatores que, segundo os autores, afetaram negativamente a qualidade do tecido neoformado. Até a atualidade, vários outros estudos *in vivo* realizados com fragmentos de dentes humanos implantados no dorso de ratos juntamente com a terapia do transplante de células apresentaram como resultado comum, a neoformação de estruturas no interior dos dentes implantados similares à polpa e dentina, mostrando o potencial dessa terapia na regeneração de tecidos do complexo dentino-pulpar (Prescott et al., 2008; Huang et al., 2010; Galler et al., 2012; Galler et al., 2018). Recentemente, Nakashima et al. (2017) conduziram o primeiro estudo clínico piloto utilizando transplante de células-tronco no canal radicular de humanos. DPSC autólogas associadas à matriz - a base de colágeno modificado para ter uma baixa atividade imunogênica funcionalizada com fator estimulador de colônias de granulócitos - foram transplantadas em dentes pulpectomizados com diagnóstico prévio de pulpíte irreversível de 5 pacientes. Após o transplante, a avaliação da sensibilidade pulpar foi aferida pelo teste ao frio e ao teste elétrico em 4, 12 e 24/28 semanas. A formação de dentina ao longo das paredes dentinárias foi avaliada através de tomografia computadorizada de feixe cônico em 16 e 28 semanas. A intensidade relativa do tecido no interior do canal radicular foi avaliada por ressonância magnética em 12 e 24 semanas pós-transplante. Assim, na quarta semana todos os

dentes mostraram resultado positivo ao teste elétrico de sensibilidade pulpar, e na vigésima quarta semana, o tecido neoformado apresentou sinais de polpa dentária normal quando avaliados através de ressonância magnética. As tomografias realizadas nos controles evidenciaram a formação de dentina funcional em 3 pacientes. Os autores concluíram que a terapia regenerativa empregada nesses pacientes utilizando a tríade da engenheira tecidual foi segura e eficaz na regeneração da polpa e da dentina. Todavia, Segundo Galler et al. (2014), o custo excessivo e logística necessária para esse procedimento a tornaria pouco viável na implementação clínica, sendo a terapia baseada no recrutamento de células-tronco endógenas uma alternativa clinicamente mais viável.

Na terapia de recrutamento celular, as células-tronco podem ser levadas ao interior do canal radicular através da indução do sangramento dos tecidos periapicais (Lovelace et al., 2011; Yamauchi et al., 2011; Nosrat et al., 2019) ou podem ser atraídas pelo efeito quimiotático de fatores de crescimento adicionados às matrizes (Kim et al., 2010; Widbiller et al., 2018b). A indução do sangramento da região periapical foi proposta por Östby (1961) com o objetivo de estudar as consequências do preenchimento da região apical do canal radicular com coágulo sanguíneo. Assim, análise histológica de dentes de humanos com apicigênese completa e polpa necrosada tratados e submetidos à ampliação foraminal com preenchimento de sangue periapical foi realizada. O autor observou que com o decorrer do tempo o coágulo sanguíneo foi substituído por tecido de granulação e posteriormente por tecido conjuntivo fibroso. Ainda, foi possível observar a deposição de tecido semelhante ao cimento nas paredes do canal radicular e no forame apical. O autor sugeriu que o preenchimento do canal radicular com coágulo sanguíneo poderia ser uma alternativa para o tratamento de dentes com apicigênese incompleta e necrose pulpar já que, através de controles radiográficos, o autor observou a continuidade do processo de formação radicular em um caso de um dente com necrose pulpar e apicigênese incompleta. Posteriormente, Ham et al. (1972) avaliaram essa abordagem em dentes de macacos com apicigênese incompleta sem ou com necrose pulpar. A análise histológica mostrou que o interior do canal radicular se encontrava preenchido por tecido conjuntivo fibroso com deposição de tecido calcificado semelhante com cimento celular ou osso ao longo das paredes do canal radicular. Assim, os autores concluíram que o fechamento apical visto radiograficamente era o resultado da

deposição irregular de tecido calcificado na região apical. Nos tempos atuais, essa abordagem foi retomada inicialmente por Iwaya et al. (2001) e posteriormente por Banchs e Trope (2004), quem introduziram o emprego da pasta tri antibiótica como medicação intracanal prévia à indução de sangramento periapical. Em ambos, os relatos de casos clínicos demonstraram radiograficamente a continuidade da formação radicular e o estreitamento da luz do canal nas radiografias de controle, onde ambos os grupos de autores denominaram essa abordagem como terapia de revascularização pulpar. A natureza do tecido formado no interior de dentes submetidos à terapia de revascularização pulpar foi analisada histologicamente por Wang et al. (2010), que observaram aposição de tecido similar ao cimento nas paredes dentinárias, e tecido similar ao osso e/ou ao tecido periodontal e/ou tecido conjuntivo fibroso na região apical e no interior do canal radicular de dentes de cães. Posteriormente, Martin et al. (2013) reportaram a primeira análise histológica de um dente humano com ápice aberto e necrose pulpar submetido à terapia de revascularização pulpar. Os autores observaram que o interior do canal radicular se encontrava preenchido por tecido conjuntivo fibroso e por tecido mineralizado osteóide ou cementóide, sem evidências de células semelhantes aos odontoblastos ou à dentina.

O estudo de Abe et al. (2007) teve grande importância da relação da indução de sangramento periapical de dentes com apicigênese incompleta e a regeneração endodôntica dentro dos conceitos da bioengenharia, pois os autores demonstraram que estes dentes possuem a papila apical, que é uma fonte rica de células-tronco. Fato evidenciado no estudo conduzido por Lovelace et al. (2011), onde mostraram através de métodos moleculares, que o sangue coletado do interior do canal radicular após a indução do sangramento de dentes com apicigênese incompleta e necrose pulpar apresentava resultados positivos para os marcadores de células-tronco CD75 e CD105. Posteriormente, Chrepa et al. (2017) confirmaram em sua investigação clínica que estas células-tronco são capazes de permanecer viáveis mesmo em condições de inflamação e necrose pulpar.

Seguindo os conceitos da tríade da bioengenharia utilizando recrutamento celular através da indução do sangramento periapical, Palma et al. (2017) propuseram-se avaliar histologicamente o efeito da combinação de matrizes a base de quitosana ao coágulo sanguíneo para a regeneração endodôntica em dentes com

ápice aberto e periodontite apical de cães. Para isso, após indução do sangramento da região periapical, o interior do canal radicular foi preenchido com sangue, e imediatamente introduzida uma matriz a base de quitosana e hialuronato de sódio ou a base de quitosana e pectina. Em outro grupo foi permitida a formação do coágulo sanguíneo sem adição de nenhuma matriz. Após 30 semanas, os dentes processados para análise histomorfométrica. Os autores reportaram que todos os grupos permitiram o desenvolvimento contínuo das paredes radiculares com presença de tecido osteóide, cementóide e semelhante ao tecido do ligamento periodontal no interior do canal radicular. Incompleta degradação com presença de áreas de inflamação foram características encontradas nos grupos onde foram empregadas as matrizes. Somente 21% dos casos, onde o canal foi preenchido com coágulo sanguíneo, foi possível observar pequenas áreas de odontoblastos neoformados. Assim, os autores concluíram que o emprego dessas matrizes associadas ao sangue não resultou em evidências histológicas de regeneração. Adicionalmente, este ensaio mostrou o potencial das células-tronco da região apical em sobreviver e diferenciar-se, mesmo em dentes com infecção. Recentemente, Nosrat et al. (2019) avaliaram clínica, radiográfica e histologicamente o resultado do emprego de coágulo sanguíneo ou de uma matriz comercial (SynOss Putty) a base de colágeno combinada com partículas de fosfato de cálcio e apatita de carbonato associada ou não ao coágulo sanguíneo no tratamento de dentes humanos com apicigênese incompleta sádios. Os autores observaram que no grupo onde foi empregada a matriz comercial sem coágulo de sangue não houve neoformação de tecidos no interior do canal radicular. Contrariamente, quando a matriz foi associada ao coágulo sanguíneo, observou-se que a neoformação tecidual limitou-se à extensão do coágulo sanguíneo no interior do canal radicular. Contudo, o tecido intrarradicular neoformado caracterizou-se por ser semelhante ao cimento com presença de restos da matriz não reabsorvidas, sem evidência de tecidos semelhantes à polpa. Os autores concluíram que, quando a matriz comercial foi empregada, sua associação ao coágulo de sangue foi fundamental para a neoformação intrarradicular de tecido mineralizado.

A capacidade de regeneração dentino-pulpar através do efeito quimiotáxico dos fatores de crescimento foi inicialmente proposta por Kim et al. (2010). Nesse estudo, os autores implantaram dentes unirradiculares humanos preenchidos com uma matriz de colágeno associada ou não a FGF, VEGF ou PDGF acrescidos ou não de BMP-7

e NGF no dorso de ratos. Após 3 semanas, os implantes foram retirados para sua análise histológica e imunohistoquímica. A expressão de NGF e DSP nos tecidos foi avaliada por meio do teste de ELISA. Os autores observaram que quando foi empregada a matriz de colágeno sem fatores de crescimento, o espaço intrarradicular apresentava-se preenchido por restos da matriz com poucos sinais de crescimento celular. Por outro lado, quando a matriz foi associada ao FGF, VEGF ou a combinação de ambos, o espaço intrarradicular apresentou-se vascularizado com presença abundante de células do hospedeiro em íntimo contato com as paredes dentinárias. A associação de FGF ou VEGF com as citocinas basais BMP e NGF resultou na expressão de DSP. Os autores concluíram que é possível a regeneração das estruturas do complexo dentino-pulpar recrutando células do próprio hospedeiro através da adição de vários fatores de crescimento na matriz implantada. Yamahushi et al. (2011) associaram proteínas da matriz dentinária expostas *in situ* ao coágulo sanguíneo periapical ou à implantação de matriz de colágeno na regeneração tecidual intrarradicular em dentes de cães com apicigênese incompleta. Os autores puderam observar que após 3,5 meses, todos os grupos tiveram o aumento das paredes do canal radicular como consequência da neoformação de tecido mineralizado semelhante ao cimento ou osso, a qual foi significativamente maior nos grupos com presença da matriz de colágeno. Além disso, nos grupos onde as proteínas da matriz dentinária foram expostas, o tecido mineralizado neoformado apresentava-se incorporados mecanicamente à parede dentinária, o qual não foi observado nos grupos onde a dentina não foi previamente desmineralizada. Em nenhum grupo foi observado a neoformação de tecidos semelhante à polpa ou à dentina, nem presença de células similares aos odontoblastos. Os autores concluíram que a associação da matriz de colágeno com o coágulo de sangue e a desmineralização parcial *in situ* da dentina no canal radicular favoreceram a neoformação de tecido mineralizado, sugerindo que o coágulo de sangue poderia servir como matriz favorecendo a migração de células-tronco da região periapical ao interior do canal radicular. Nagy et al. (2014) avaliaram o potencial de regeneração de dentes humanos com apicigênese incompleta e necrose pulpar empregando como matriz coágulo sanguíneo ou sua associação com uma matriz injetável a base de gelatina misturada com o fator de crescimento básico de fibroblasto. Os autores observaram, através do acompanhamento radiográfico de 18 meses, que ambas as abordagens propostas resultaram no aumento progressivo do comprimento e largura da raiz e diminuição no

diâmetro apical, concluindo que o emprego da matriz misturada com o fator de crescimento não foi necessário para o resultado obtido.

A quimiotaxia celular utilizando fatores de crescimento para a regeneração endodôntica também tem sido proposta em casos de dentes com rizogênese completa, no entanto, Nabeshima et al. (2018) chama a atenção para a importância da vascularização para nutrição celular em dentes com canal radicular vazio objetivando a neoformação tecidual intrarradicular. Os autores associaram o VEGF ao coágulo sanguíneo induzido da região periapical para a avaliação *in loco* utilizando dentes de ratos com rizogênese completa, e observaram que o emprego do VEGF associado ao coágulo sanguíneo promoveu maior rapidez na angiogênese com formação de tecido conjuntivo intracanal. No entanto a presença de células semelhantes aos odontoblastos não foi observada. De Cara et al. (2019) realizaram um ensaio ortotópico para avaliar a angiogênese também em dentes de ratos com rizogênese completa, porém os autores utilizaram coágulo sanguíneo associado ao meio condicionado previamente com células-tronco de dentes decíduos. As análises *in vitro* iniciais demonstraram que o meio condicionado apresentava expressão positiva para VEGF, e que o mesmo em contato com HUVEC apresentava aumento da síntese celular de VEGF em cultura. Os resultados apresentaram *in vivo* a formação de tecido conjuntivo com presença de vasos sanguíneos confirmados imunohistoquimicamente pela forte marcação positiva contra VEGFR2.

Outros artifícios têm sido sugeridos para a regeneração endodôntica utilizando quimiotaxia de células-tronco e coágulo sanguíneo. Nisto, Moreira et al. (2017) propuseram a fotobiomodulação para a regeneração pulpar em dentes de ratos com rizogênese completa. Os autores instrumentaram canais de ratos, realizaram irrigação final com EDTA 17%, induziram o sangramento periapical para formação de coágulo sanguíneo intracanal, e irradiaram uma aplicação de laser diodo InGAlP sobre o coágulo. Três das onze amostras do grupo experimental apresentaram a formação de tecido conjuntivo imaturo com fibras colágenas menos espessas que o tecido original, no entanto apresentaram positividade imunohistoquímica para células similares aos odontoblastos e aos vasos sanguíneos. Os autores concluíram que a terapia por fotobiomodulação pode ser um adjunto capaz de melhorar a regeneração tecidual pulpar.

No que se refere às outras matrizes associadas a biomoléculas propondo quimiotaxia de células-tronco, Widbiller et al. (2018b) compararam o potencial de recrutamento de 3 diferentes matrizes naturais em forma de hidrogel: fibrina, selante de fibrina, plasma rico em fator de crescimento e uma matriz sintética a base de peptídeo de automontagem. Para tal, empregaram um modelo *in vivo* ectópico, onde o canal radicular foi preenchido pela matriz associada ou não com extrato proteico obtido da matriz dentinária, utilizando prévio condicionamento radicular com EDTA 10%. Após a gelificação das matrizes, o ápice radicular foi coberto com colágeno em gel contendo DPSC e imediatamente o dente foi implantado no dorso de ratos imunossuprimidos. Como grupo controle, foram empregadas as mesmas matrizes sem adição do extrato e sem condicionamento prévio. Após 4 semanas, os dentes implantados foram extraídos para a análise histológica e imunohistoquímica do tecido intrarradicular formado. Os autores observaram que a associação das matrizes com o extrato proteico resultou em maior crescimento de tecido intrarradicular com presença de células diferenciadas aderidas à parede dentinária. A análise imunohistoquímica confirmou a origem humana dessas células. O hidrogel de plasma rico em fatores de crescimento associado com extrato proteico permitiu maior crescimento de tecido intrarradicular, e o peptídeo de automontagem produziu o menor crescimento tecidual. Contudo, nenhum dos grupos avaliados apresentou frequências acima de 50% de canais completamente preenchidos por tecido neoformado. Os autores concluíram que é possível o crescimento de tecido intrarradicular pela migração celular, sendo que o material das matrizes empregadas influencia no grau de neoformação tecidual, e que a presença de fatores de crescimento é necessária para o recrutamento e diferenciação odontoblástica das células-tronco.

Assim, de acordo com o exposto, pode-se inferir que independentemente da estratégia empregada – células transplantadas ou recrutadas, as matrizes possuem um papel fundamental na regeneração das estruturas do complexo dentino-pulpar, permitindo a adesão, proliferação e diferenciação celular.

2.2 MATRIZES EMPREGADAS PARA A REGENERAÇÃO ENDODÔNTICA

Em geral, a principal função das matrizes é servir de estrutura tridimensional para a organização do tecido em desenvolvimento. Para isso, a composição deste material deve favorecer a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, permitindo o transporte de nutrientes, resíduos metabólicos e de biomoléculas, características necessárias para garantir a sobrevivência celular (Bonassar; Vacanti, 1998; Garg et al., 2012).

No que se refere à regeneração endodôntica, o primeiro material proposto como matriz foi o coágulo sanguíneo associado ou não com gelatina (Myers; Fountain, 1974). Assim, visando a regeneração pulpar, dentes de macacos com periodontite apical foram instrumentados e posteriormente preenchidos com sangue do próprio animal, coagulado *in situ* pela adição de trombina associado ou não com gelatina. Após tempos experimentais de 2 semanas, 3 ou 6 meses, os dentes processados para sua análise histológica. Os autores observaram tecido de granulação invaginado nos milímetros finais do canal radicular de todos os grupos, concluindo que o emprego do coágulo sanguíneo e a associação testada não resultaram na regeneração pulpar. Posteriormente, Nevins et al. (1976) desenvolveram uma matriz injetável a base de colágeno e fosfato de cálcio com o objetivo de promover o fechamento apical de dentes com ápice imaturo de macacos. Após 12 semanas, a análise histológica mostrou que o canal radicular se encontrava preenchido por tecido conjuntivo frouxo vascularizado. Além disso, observou-se a deposição de tecido semelhante a osso e cimento nas paredes do canal radicular, resultando no estreitamento do espaço intraradicular e do forame apical, concluindo que a matriz proposta tinha potencial para a regeneração de dentes pulpectomizados. Assim, Nevins et al. (1977) reportaram o primeiro caso clínico no qual empregaram a mesma matriz no tratamento de um dente traumatizado apresentando ápice aberto em uma criança de 8 anos. A radiografia de controle realizada após 6 meses evidenciou a continuidade do processo de formação radicular. Os autores reportaram o tratamento realizado como uma nova técnica biológica de obturação na terapia endodôntica. Neste sentido, posteriormente, Machado (1992) propôs por meio de uma revisão de literatura, a utilização de dentina desmineralizada para auxiliar na obturação biológica de dentes após tratamento

endodôntico. O autor conclui que o tecido mineralizado formado não corresponde à dentina, e chama atenção para cuidados, tais como a esterilização da dentina a ser utilizada e o método empregado para a desmineralização, além da importância de uma boa irrigação sanguínea local.

Na engenharia tecidual, as matrizes desempenham papel crítico dirigindo o crescimento tecidual por meio das células inoculadas em sua superfície ou favorecendo a migração celular dos tecidos circundantes. A matriz ideal necessita atender alguns requisitos, tais como: ser biocompatível, biodegradável e porosa, favorecendo a adesão, migração e proliferação celular (Garg *et al.*, 2012). Adicionalmente, devido à vida útil curta dos fatores de crescimento (Saltzman, 1996), se faz necessário o desenvolvimento de matrizes que permitam a adição e a liberação controlada dessas biomoléculas para sinalizar a diferenciação celular (Langer; Vacanti, 1993). No que se refere à regeneração das estruturas do complexo dentino-pulpar, além das características já expostas e devido às condições próprias do canal radicular, as matrizes devem favorecer a vascularização e inervação, permitir a incorporação de fatores de crescimento relevantes para a diferenciação odontoblástica, e nos casos de necrose pulpar, devem permitir o controle das bactérias residuais presentes no interior do canal radicular (Galler *et al.*, 2011a).

Na atualidade, vários materiais têm sido propostos como potenciais matrizes para a regeneração dos tecidos do complexo dentino-pulpar, podendo se classificar em dois grupos de acordo com sua origem: naturais ou sintéticas, que de acordo com sua forma podem ser sólidas ou hidrogéis (Galler *et al.*, 2011a). Os materiais naturais têm como vantagem principal possuir composição semelhante à matriz extracelular dos tecidos, por outro lado, os materiais artificiais oferecem como principal vantagem o controle elevado sobre suas características físico-químicas (Garg *et al.*, 2012; Galler *et al.*, 2011a). Recentemente, a comparação entre matrizes naturais e sintéticas foi realizada por Galler *et al.* (2018). Nesse estudo, os autores compararam *in vitro* sete diferentes tipos de matrizes - cinco hidrogéis artificiais: polietilenoglicol de cura química, fotopolimerizável ou funcionalizado, peptídeo de automontagem modificado a base da sequência 21 peptídeos aminoácido ou comercial (PuraMatrix); e dois hidrogéis naturais: colágeno tipo I e fibrina. A viabilidade celular das DPSC nas matrizes foi avaliada em 1, 3, 5, 7 e 14 dias através do ensaio de MTT e coloração de *live/dead*. Então, as matrizes a base de fibrina, polietilenoglicol de cura química ou

fotopolimerizável e de peptídeo de automontagem modificado, misturadas ou não com extrato das proteínas da matriz dentinária, foram analisadas *in vivo*. Para isso, cilindros de dentina preenchidos com as matrizes inoculadas com DPSC foram implantados no dorso de ratos imunossuprimidos. Após 4 semanas, os implantes foram retirados e processados para análise histológica e imunohistoquímica. Os autores reportaram que nos testes *in vitro* a viabilidade celular foi maior nos hidrogéis naturais que nos artificiais. O experimento *in vivo* mostrou que 83% dos cilindros carregados com a matriz de fibrina e 33% dos cilindros carregados com a matriz de peptídeo de automontagem, ambas associadas com extrato das proteínas da matriz dentinária apresentaram-se preenchidos por tecido similar à polpa dentária. O interior dos cilindros nos outros grupos encontrava-se vazio ou preenchido com tecido conjuntivo desorganizado com presença de células dispersas. Assim, os autores concluíram que as matrizes naturais, especialmente à base de fibrina, permitiram a viabilidade celular e a formação de tecido semelhante à polpa, que foi superior às matrizes artificiais. A adição do extrato proteico à matriz de fibrina contribuiu positivamente na formação desse tipo de tecido, devido à capacidade da fibrina de se ligar e permitir a liberação lenta dessas biomoléculas.

As matrizes em forma de hidrogel têm sido amplamente estudadas na regeneração endodôntica devido à facilidade de introdução no canal radicular por meio de injeção, adaptando-se as paredes dentinárias ao longo de toda a raiz (Fukushima et al., 2019). Nesse sentido, Huang et al. (2006) cultivaram células-tronco da polpa dentária sobre dois tipos de hidrogéis a base de colágeno tipo I de origem bovina ou obtido da cauda de ratos. Os autores observaram que as células-tronco causaram uma contração das matrizes resultando na diminuição à metade do seu tamanho inicial entre 3 e 15 dias de cultivo. A contração da matriz resultou na migração das células para fora. Adicionalmente, observaram que as células-tronco proliferaram mais rapidamente no poço de cultura celular que no interior dos hidrogéis. Concluindo que os hidrogéis de colágeno não são adequados para a regeneração pulpar devido à acentuada contração pelas células na matriz. Os autores sugeriram que *in vivo* a contração do hidrogel após inserção na raiz radicular poderia levar ao desprendimento das células das paredes dentinárias, resultando em espaços vazios que comprometeriam a neoformação tecidual, sendo necessário o desenvolvimento de matrizes resistentes à contração. Rosa et al. (2013) observaram que a viscosidade

do hidrogel influencia na regeneração pulpar. Nesse estudo, os autores compararam a diferenciação odontoblástica de células-tronco de dentes decíduos no hidrogel à base de peptídeos (Puramatrix) ou a base de colágeno recombinante humano tipo I. Para isso, cultivaram *in vitro* células-tronco ressuspendidas nos hidrogéis em dentes humanos. Após 7 e 24 dias, o conteúdo do canal foi removido para a análise da expressão gênica de DMP-1, DSPP, e MEPE através de RT-PCR. Os autores observaram que a expressão de marcadores odontoblásticos pelas células-tronco precisou de maior tempo quando elas foram cultivadas no hidrogel a base de colágeno, sugerindo que a alta viscosidade dessa matriz poderia ter contribuído a retardar a migração celular até as paredes do canal radicular e/ou desacelerar a difusão das biomoléculas derivadas da dentina. Concluindo que as propriedades físicas da matriz, como a sua viscosidade, possuem um papel importante na regeneração pulpar.

A respeito de matrizes sólidas, o primeiro ensaio do comportamento *in vivo* e *in vitro* de células-tronco da polpa dental nestas matrizes foi conduzido por Zang et al. (2006). Nesse estudo, os autores inocularam as células-tronco em três diferentes materiais, a saber: esponja de colágeno, cerâmica porosa e malha de titânio fibroso. No estudo *in vitro*, as matrizes inoculadas foram cultivadas em meio osteogênico durante 4 semanas. Posteriormente, as matrizes foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura, e a expressão de DSPP foi determinada pelo método de RT-PCR. *In vivo*, as matrizes inoculadas foram implantadas no dorso de ratos por 6 e 12 semanas, e analisadas através de microscopia de luz, RT-PCR e imunohistoquímica. Os autores observaram que, *in vitro* as células depositaram matriz extracelular mineralizada abundante, com expressão de DSPP sem diferença entre os materiais empregados. *In vivo*, observou-se a formação de tecido conjuntivo vascularizado com expressão positiva de DSPP com neoformação limitada de tecido mineralizado em todos os materiais implantados. Os autores concluíram que o comportamento *in vivo* de DPSC em diferentes materiais de matrizes sólidas deveria ser mais estudado antes de se considerar possível a regeneração endodôntica utilizando esses materiais. Nesse sentido, Qu et al. (2015), inspirados na estrutura anatômica do complexo de dentino-pulpar, onde um tecido rígido (dentina) envolve um tecido mole (pulpar), se propuseram avaliar se a rigidez da matriz é uma característica física que influencia na diferenciação celular. Assim, os autores

confeccionaram uma matriz a base de nanofibras de gelatina associadas ao fosfato de β -tricálcio obtida pelo método de congelamento e liofilização. Para modificar a rigidez da matriz, esta foi reticulada quimicamente com EDC e NHS por 30 minutos, 1 hora ou 4 horas. A caracterização morfológica da matriz foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura, e o módulo de elasticidade das diferentes áreas da matriz foi determinado através do ensaio mecânico de compressão. Nos estudos *in vitro*, células-tronco da polpa dentária foram inoculadas sobre a matriz e cultivadas em meio osteogênico. Após 2 e 3 dias de cultivo, foram avaliadas a morfologia e a proliferação celular com quantificação de DNA através de fluorescência com Hoechst 33258, respectivamente, e após 4 semanas, a formação de matriz mineralizada pela coloração de von Kossa e a expressão gênica de Col-1, OCN, DMP-1, ALP, e DSPP pelo método de qRT-PCR. Adicionalmente, para o estudo *in vivo* foram confeccionadas matrizes de gelatina rígida na periferia e com baixa rigidez ao centro. Após uma semana de cultivo em meio osteogênico, as matrizes inoculadas com as células foram implantadas no dorso de ratos imunossuprimidos. Após 4 semanas, as matrizes analisadas histologicamente pela coloração de hematoxilina e eosina e de von Kossa, e imunohistoquimicamente pela expressão de DSPP e Col-1. Morfologicamente, as matrizes apresentaram uma alta porosidade com tamanho entre 250 e 420 μm . A resistência mecânica aumentou com o tempo de reticulação, assim as matrizes reticuladas por 30 minutos apresentaram baixa rigidez, as matrizes de 1 hora resultaram em meia rigidez, e as de 4 horas obtiveram alta rigidez. No estudo *in vitro*, as células-tronco inoculadas nas matrizes rígidas apresentaram mais espalhadas, e seu citoesqueleto mais organizado do que quando cultivadas em matriz com baixa rigidez. As matrizes de alta rigidez promoveram a diferenciação das células-tronco para formar tecido mineralizado, e as matrizes de baixa rigidez promoveram diferenciação para formar tecido conjuntivo frouxo. *In vivo*, a neoformação de tecido mineralizado só foi observada na periferia altamente rígida da matriz. A parte central da matriz de baixa rigidez apresentou alta expressão de Col-1 e neovascularização. A expressão de DSPP foi observada nas células localizadas na interface da matriz mais rígida e menos rígida. Assim, os autores concluíram que a rigidez da matriz é um fator fundamental para modular a diferenciação das células-tronco da polpa dental.

A comparação de matrizes em forma sólida ou de hidrogel foi recentemente reportada por Yu et al. (2019). Nesse estudo, os autores desenvolveram uma matriz

a base de alginato e gelatina empregando o método de bioimpressão tridimensional. Para isso, após mistura dos hidrogéis de gelatina e alginato, realizaram a bioimpressão obtendo poros uniformes de 400 µm. Posteriormente, a matriz foi reticulada com glutaraldeído e liofilizada. Adicionalmente, foram preparados hidrogéis a base de gelatina e alginato reticulado com glutaraldeído. *In vitro*, células-tronco da polpa dental foram cultivadas em ambas as matrizes, e após 5 dias, a adesão e crescimento celular na superfície das matrizes foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. A proliferação das células-tronco em meio puro ou condicionado pela matriz foi avaliada através de citometria de fluxo, e o ensaio de contagem celular Kit-8 em 1, 2 e 5 dias de cultivo. A diferenciação das células-tronco em meio mineralizante puro ou contendo extrato das matrizes foi avaliada aos 14 e 21 dias através da coloração com vermelho de alizarina e da fosfatase alcalina. Os autores observaram que maior número de células aderiu e proliferou nas matrizes em forma sólida que em forma de hidrogéis. O meio condicionado pelas matrizes sólidas promoveu maior proliferação das células-tronco quando comparado ao meio condicionado pelo hidrogel ou ao meio puro. O extrato de ambas as matrizes promoveu a diferenciação odonto-osteogênica significativamente maior quando foi empregado o meio mineralizante puro. Os autores concluíram que a matriz a base de gelatina e alginato em forma sólida obtida pelo método de impressão tridimensional foi mais adequada que a matriz em forma de hidrogel para a adesão e proliferação celular.

A porosidade das matrizes é uma característica importante porque influencia diretamente na penetração das células e dos vasos sanguíneos no seu interior. Assim, poros pequenos impedem a penetração celular e poros grandes inibem a adesão celular (Garg et al. 2012). O tamanho dos poros é influenciado pelo método de processamento para a obtenção das matrizes. O método de automontagem consiste na organização autônoma dos componentes em uma estrutura específica. Esse método é amplamente empregado para produzir matrizes em forma de gel com base em peptídeos, porém o método não permite um controle sobre o tamanho do poro (Gupte; Ma, 2012). Por outro lado, o método de congelamento e liofilização consiste na sublimação imediata do solvente empregado para a dissolução do material da matriz. Assim, o solvente congelado é levado diretamente do estado sólido ao estado gasoso pelo aumento do calor e o vácuo gerado na liofilização. Esse método é

amplamente empregado para a fabricação de matrizes sólidas com poros de tamanhos diversos e interconectados (Garg et al. 2012). Nesse sentido, O'Brien et al. (2005) se propuseram estudar a relação entre a adesão, a viabilidade celular e o tamanho do poro da matriz. Para isso, empregaram células osteogênicas de ratos cultivadas em quatro tipos de matrizes a base de colágeno e glicosaminoglicano com diferentes tamanhos de poros: 150 μm , 121 μm , 109 μm ou 95,9 μm , obtidas pelo método de congelamento e liofilização. Após 24 e 48 horas de cultivo, as células aderidas na matriz foram coradas com azul de tripan e contadas. Os autores observaram que a fração de células viáveis aderidas à matriz diminuiu com o aumento do tamanho médio dos poros, concluindo que a adesão e proliferação celular são influenciadas pelas características da superfície da matriz. O efeito do tamanho do poro na adesão e proliferação de células-tronco de origem dentária não tem sido objeto de estudo.

A reticulação é um processo químico ou físico que visa unir as moléculas de um material entre si ou com as moléculas de outro material através do emprego de substâncias sintéticas ou naturais. Esse processo resulta na modificação, das características físico-químicas da matriz aumentando sua resistência mecânica e reduzindo sua taxa de degradação. O primeiro estudo do emprego de reticulantes para melhorar a regeneração endodôntica foi conduzido por Nevins et al. (1980). Nesse estudo, os autores empregaram glutaraldeído para reticular uma matriz em forma de hidrogel a base de colágeno e fosfato de cálcio. A matriz desenvolvida foi injetada em dentes de macacos parcialmente pulpectomizados. Os animais foram sacrificados em diferentes tempos experimentais de 3, 4, 5, 6 e 8 meses, e os dentes processados e corados com hematoxilina e eosina e pela técnica de tricômio de Masson para análise histológica. Assim, aos 3 meses, os autores observaram a presença de tecido conjuntivo vascularizado com áreas de tecido semelhante ao cimento e ao osso ao redor e dentro do hidrogel e na parede dentinária. Aos 4, 5, 6 e 8 meses o hidrogel foi progressivamente reabsorvido, e continuou a deposição de tecido mineralizado. Os autores concluíram que o substrato tridimensional fibroso cristalino formado pela reticulação do hidrogel de colágeno e fosfato de cálcio permitiu a migração celular em direção cervical com deposição de tecido mineralizado. Mais atualmente, Moura et al. (2011) avaliaram o efeito da co reticulação física e química nas características de matrizes em forma de hidrogéis a base de quitosana visando a regeneração de osso.

Os autores reportaram que a reticulação física com glicerol fosfato resulta em rápida degradação dos hidrogéis, no entanto, a co-reticulação da matriz empregando genipina como reticulante químico e glicerol fosfato como reticulante físico diminui a taxa de degradação de maneira dose depende sem afetar sua biocompatibilidade, concluindo que quanto maior a concentração de genipina menor será a taxa de degradação da matriz. Assim, Kwon et al. (2015) propuseram avaliar o efeito da genipina na viabilidade e diferenciação odontoblástica das células-tronco da polpa dental e seu efeito sobre as propriedades biológicas e físico-químicas de matrizes de colágeno. Para isso, os autores avaliaram a biocompatibilidade da genipina em concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1 mmol/l sobre células-tronco da polpa dental através do ensaio de MTT. O efeito das mesmas concentrações de genipina na diferenciação odontoblástica foi avaliado através da atividade da fosfatase alcalina, RT-PCR, Western blotting e coloração com vermelho de alizarina. Como grupo controle, para todos esses testes *in vitro* foi empregado meio de cultivo sem adição de genipina. Adicionalmente, a morfologia e a diferenciação odontoblástica das células-tronco sementeadas nas matrizes de colágeno reticuladas ou não com genipina na concentração 0,01 mmol/l foi avaliada após 3 dias através de MEV e RT-PCR, respectivamente. A rugosidade das matrizes reticuladas ou não foi avaliada através de microscopia de força atômica, e suas propriedades mecânicas através do ensaio de compressão. Os autores reportaram que a proliferação de células-tronco em presença das concentrações de genipina testadas não foi estatisticamente diferente ao grupo controle. A atividade da fosfatase alcalina, a expressão de marcadores odontogênicos e a formação de nódulos de mineralização aumentaram na presença da genipina. As células-tronco cultivadas na matriz não reticulada de colágeno apresentaram forma esferóide, e na matriz reticulada apresentaram forma espreada. A proliferação e a expressão dos marcadores DSPP e DMP-1 foi estatisticamente superior nas células cultivadas nas matrizes reticuladas em relação às não reticuladas. As propriedades mecânicas da matriz de colágeno, como resistência à compressão e rugosidade superficial, foram melhoradas pela reticulação. Os autores concluíram que a melhoria das propriedades mecânicas da matriz de colágeno pela reticulação com genipina desempenhou um papel importante na diferenciação celular. Na medicina, Zhang et al. (2016) compararam o emprego de substâncias sintéticas ou naturais para reticulação química de matrizes visando a regeneração de fígado. Para isso, foram preparadas matrizes a base de quitosana e gelatina empregando como

reticulante sintético o glutaraldeído ou o EDC, ou empregando a genipina como reticulante natural. A viabilidade da linhagem celular HepG2 inoculadas nas matrizes reticuladas com as diferentes substâncias foi avaliada através do ensaio de MTT e através da quantificação de DNA. Adicionalmente, a morfologia dessas células cultivadas nas matrizes foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura. Os autores reportaram que a viabilidade celular nas matrizes reticuladas com 1% de genipina foi significativamente maior que a dos outros grupos. Além disso, as matrizes reticuladas com genipina permitiram adesão e proliferação celular superior que os reticulantes sintéticos.

Outra característica desejável das matrizes a serem empregadas na regeneração do complexo dentino-pulpar é a de permitir o controle das bactérias residuais presentes no interior do canal radicular de dentes com necrose pulpar onde seria aplicada a estratégia regenerativa (Galler et al., 2011a). Na endodontia regenerativa, diversos protocolos de desinfecção utilizando irrigantes associados a antibióticos como medicação intracanal têm sido propostos, porém, nenhum deles resulta num ambiente 100% livre de bactérias (Nagata et al., 2014). Assim, com o objetivo de determinar o efeito da presença de bactérias residuais na regeneração pulpar, Verma et al. (2017) induziram lesões periapicais em dentes de furões, que tiveram os canais tratados por meio de irrigação com hipoclorito de sódio 1,25%, seguida de pasta triantibiótica por uma semana como medicação intracanal. Posteriormente a esse período, os dentes foram irrigados com EDTA 17%, e divididos em dois grupos segundo a terapia endodôntica empregada. No grupo 1, foi realizado o protocolo de revascularização, e no grupo 2, foi realizado um protocolo de regeneração com células-tronco da polpa dentária de furões encapsuladas em hidrogel de alginato-fibrina-trombina. Depois de 3 meses os animais foram sacrificados, e os dentes processados para análise histopatológica por hematoxilina e eosina, e histobacteriológica por coloração de Brown e Brenn. Assim, foi observado que independentemente a terapia empregada, os casos onde foi identificada a presença de bactérias residuais apresentaram menor crescimento radicular, menor deposição de tecido mineralizado neoformado, além de presença de áreas de necrose e áreas com infiltrado inflamatório no interior do canal radicular. Assim, os autores concluíram que, as bactérias que resistem aos protocolos de desinfecção têm um

efeito negativo na regeneração do complexo dentino-pulpar, colocando em risco o sucesso da terapia endodôntica regenerativa.

O efeito do biofilme bacteriano e dos antígenos bacterianos sobre a diferenciação das células-tronco foi avaliado por Vishwanat et al. (2017). Para isso, os autores contaminaram segmentos da região apical de dentes humanos com *E. faecalis* por 30 dias. Após o período de contaminação, os dentes foram submetidos ao protocolo de desinfecção que consistia em irrigação com hipoclorito de sódio 1,5%, seguido de EDTA 17% e aplicação de pasta triantibiótica por um período de 14 dias. Então, a pasta foi removida e o canal novamente irrigado com EDTA 17% seguido de solução salina esterilizada. Posteriormente, o canal foi preenchido com Matrigel contendo SCAP e incubados em meio osteogênico ou não pelo período de 4 semanas. Após esse período, a quantidade total de RNA foi isolada das SCAP e a análise da expressão gênica para marcadores dentinogênicos/ osteogênicos foi realizada pelo método quantitativo de RT-PCR. Para analisar o efeito dos antígenos bacterianos na diferenciação das SCAP, as células foram cultivadas na presença ou não de *E. faecalis* inativados ou não em meio osteogênico pelo período de 4 semanas. Após, a formação de matriz mineralizada foi avaliada pelo método de vermelho de alizarina e pela atividade da fosfatase alcalina. Os autores observaram que após o protocolo de desinfecção empregado no estudo, bactérias viáveis foram detectadas pelo método de cultura bacteriana. Essas bactérias residuais alteraram a expressão gênica das SCAP resultando na redução de expressão dos genes DSPP e ALP e no aumento da expressão dos genes BSP, OCN, DLX-5 e RUNX2. Além disso, a presença de antígenos bacterianos reduziu a capacidade das SCAP de formar depósitos minerais. Assim, os autores concluíram que a presença de bactérias residuais altera a diferenciação das SCAP levando-as à expressão de um fenótipo osteoblástico, e a presença de antígeno bacteriano influencia adversamente o potencial de diferenciação de tecidos mineralizados das SCAP. Assim, diante a possibilidade da presença de bactérias residuais após os procedimentos de desinfecção e o seu impacto negativo na terapia endodôntica regenerativa, estudos devem ser conduzidos para melhorar os protocolos de desinfecção atuais sem produzir um impacto negativo na terapia regenerativa.

No que se refere ao controle de assepsia, uma alternativa pouco explorada pela literatura é o desenvolvimento de matrizes biofuncionalizadas com substâncias

apresentando atividade antimicrobiana sem impactar negativamente na adesão, proliferação e diferenciação das células-tronco nas matrizes. Nesse sentido, Chatzistavrou et al. (2014) desenvolveram uma matriz híbrida através da adição de partículas sintéticas de biovidro e prata num hidrogel natural obtido a partir da decelularização da bexiga de porcos. O crescimento bacteriano nos inóculos de *E. coli* ou *E. faecalis* misturados com a matriz foi avaliado pela densidade óptica do meio de cultura após 12 horas de incubação e pelo número de UFC obtido das amostras após 24 horas de incubação. A citotoxicidade das matrizes foi avaliada pela cultura de células da polpa durante 24 horas em meio condicionado pela matriz. Os autores observaram que a matriz híbrida desenvolvida inibiu o crescimento bacteriano de ambas as cepas, e o meio condicionado pelas matrizes não foi citotóxico para as células da polpa dentária. Aspectos relacionados à adesão, proliferação e diferenciação das células da polpa na matriz não foram analisados nesse estudo. Kwon et al. (2017) avaliaram através do teste de difusão em ágar o efeito antibacteriano de dois reticulantes -10 mmol/l epigallocatechin gallate e de 10 mmol/l de glutaraldeído, observando que ambas as substâncias produziram halos de inibição sem diferença significativa sobre cepas de *S. mutans*, *F. nucleatum* ou *E. faecalis*. Além disso, avaliaram o efeito citotóxico produzido pelo contato direto de diferentes concentrações de ambas as substâncias sobre DPSC através do ensaio de MTT observando que concentrações abaixo de 10 mmol/l de Epigallocatechin Gallate não apresentam efeito adverso sobre a viabilidade das DPSC, contrariamente, todas as concentrações de glutaraldeído testadas foram citotóxicas, assim como o Epigallocatechin Gallate numa concentração de 100 mmol/l. Finalmente, os autores compararam matrizes de colágeno reticuladas ou não com epigallocatechin gallette, observando que as matrizes reticuladas apresentavam maior número de DPSC, favorecendo sua adesão, proliferação e diferenciação quando comparadas com as células cultivadas nas matrizes não reticuladas de colágeno. Assim, os autores concluíram que o epigallocatechin gallate como reticulante melhora as propriedades físicas e biológicas das matrizes de colágeno, inferindo que devido à atividade antimicrobiana apresentada pelo epigallocatechin gallate, as matrizes reticuladas com essa substância também apresentariam atividade antimicrobiana, contudo nesse estudo não foi diretamente analisado o efeito antibacteriano das matrizes. Adicionalmente, os autores ressaltaram a alta toxicidade do glutaraldeído sobre as células, mesmo em concentrações mínimas. Recentemente, Ducret et al. (2019)

desenvolveram um hidrogel natural a base de fibrina e quitosana. O efeito antimicrobiano da adição de quitosana na matriz de fibrina foi avaliado pelo número de UFC/ml obtido após incubação por 6 horas de 70 µl do hidrogel misturado com 150 µl de inoculo de *E. faecalis* numa concentração aproximada de 2×10^3 UFC/ml. Além disso, foi avaliada a viabilidade, morfologia e ultraestrutura das DP-MSCs nas matrizes de fibrina ou de fibrina e quitosana através de microscopia de fluorescência e de transmissão. A proliferação celular e a produção de matriz colagenosa das DP-MSCs nas matrizes de fibrina ou de fibrina e quitosana foi avaliada pelo método quantitativo de RT-PCR e imunohistoquímica. Os autores observaram que a adição de quitosana na matriz de fibrina reduz significativamente o número de UFC/ml quando comparado com a matriz de fibrina e com o crescimento bacteriano obtido em ausência dos hidrogéis. Por outro lado, a viabilidade celular e a taxa de proliferação das DP-MSCs encapsuladas nos hidrogéis de fibrina e de fibrina com quitosana foi similar, apresentando características morfológicas semelhantes aos fibroblastos, e com capacidade de produção de colágeno tipo I / III. Os autores concluíram que a matriz de fibrina com adição de quitosana apresenta atividade antimicrobiana sem alterar as propriedades regenerativas das matrizes de fibrina.

Como exposto, as características morfológicas, físico-químicas, biológicas e antimicrobianas das matrizes influenciam no comportamento celular. Ainda as interações entre seus componentes podem refletir em diferentes comportamentos. Assim, é importante a avaliação destas características para verificar o potencial da matriz na regeneração de determinado tecido.

2.3 MATRIZES TRIDIMENSIONAIS POROSAS A BASE DE QUITOSANA E SUAS ASSOCIAÇÕES EMPREGADAS NA REGENERAÇÃO ENDODÔNTICA

A quitosana é um polissacarídeo catiônico de natureza hidrofílica obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina. O material de origem da quitosana, a quitina, é um constituinte importante do exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos. Quimicamente, a quitosana é composta por unidades de glicosamida e N-acetil

glicosamida unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$, estrutura química similar aos dos glicaminoglicanos presentes na matriz extracelular do tecido conjuntivo (Suh; Matthew, 2000). As soluções de quitosana apresentam atividade bacteriostática sobre um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas, porém essa propriedade é influenciada por fatores intrínsecos da quitosana como a fonte de obtenção, grau de desacetilação, peso molecular, pH e pela sua associação com outras substâncias (Hosseinnejad; Jafari, 2016).

Na engenharia tecidual, as matrizes elaboradas a partir da quitosana, quando obtidas pelo método de congelamento e liofilização, têm como características formar estruturas sólidas porosas interconectadas adotando a forma do recipiente que continha a solução de quitosana antes do congelamento (Madhally; Matthew, 1999). As matrizes obtidas têm como característica ser biocompatíveis e biodegradáveis, apresentando baixa citotoxicidade e não antigênicas nem carcinogênicas, sendo amplamente aplicadas na regeneração de pele, osso, cartilagem, fígado, vasos sanguíneos e nervos (Kim et al., 2009).

O primeiro estudo relacionado à quitosana para a regeneração endodôntica foi conduzido por Chen e Fan (2007). Os autores desenvolveram uma matriz tridimensional porosa composta de quitosana associada com carboximetil celulosa obtida pelo método de congelamento e liofilização. A caracterização morfológica das matrizes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. A adesão e proliferação de células da polpa nas matrizes foi avaliada durante os cinco primeiros dias pelo ensaio de MTT e no sétimo dia através de microscopia eletrônica de varredura e confocal, a expressão de OM e DSPP nas células inoculadas foi avaliada aos 7 e 14 dias através da técnica de RT-PCR, e a biocompatibilidade das matrizes avaliada através da sua implantação no dorso de ratos por 4 semanas. Para todos os testes, matrizes de quitosana sem adição de carboximetil celulosa elaboradas pela mesma técnica foram empregadas como controle. Os autores reportaram que a adição de carboximetil celulosa nas matrizes de quitosana diminuiu o tamanho dos poros aumentando sua interconectividade e porosidade. A degradação das matrizes após 30 dias foi de 1% nas matrizes compostas e de 4% nas matrizes de quitosana pura. As eletromicrografias obtidas mostraram maior número de células aderidas nas matrizes compostas em forma de *clusters* ou dispersas aleatoriamente sobre sua superfície. Além disso, nas matrizes de quitosana pura, as células apresentaram-se

morfologicamente esféricas, e nas matrizes compostas apresentaram-se espalhadas com sua morfologia normal semelhante aos fibroblastos. A porcentagem de células viáveis na matriz composta, assim como a expressão de OM e DSPP foi significativamente maior que nas matrizes de quitosana pura. No teste *in vivo*, ambas as matrizes se mostraram biocompatíveis com presença de sinais de vascularização, sendo que a matriz composta apresentou maior infiltração de células inespecíficas. Os autores concluíram que a adição de carboximetil celulosa nas matrizes de quitosana melhorou suas características como material para ser empregado na regeneração endodôntica. Posteriormente, Kim et al., (2009) compararam a adesão, a proliferação e a diferenciação de DPSC em poços de cultura celular revestidos com colágeno tipo I, colágeno tipo II, gelatina ou quitosana. A adesão celular foi avaliada através de coloração com azul de toluidina aos 90 minutos após sua inoculação, e a proliferação foi avaliada pela densidade obtida após 0, 10, 20 e 36 horas empregando sal de tetrazólio solúvel em água, a diferenciação celular precoce foi avaliada através do ensaio da atividade da fosfatase alcalina aos sete dias, a diferenciação odontogênica foi investigada por meio da análise da expressão gênica de OCN, DSPP e DMP-1 através da técnica de RT-PCR aos 5, 10, 25 e 20 dias, e a mineralização da matriz extracelular foi avaliada após 15, 20, 25 e 30 dias através do ensaio de vermelho de alizarina. Os autores constataram que não houve diferença na adesão, proliferação e diferenciação precoce das células inoculadas nos poços revestidos com colágeno tipo I, tipo III e com gelatina, porém, os poços revestidos com quitosana apresentaram níveis significativamente inferiores de adesão, proliferação e diferenciação celular que os outros grupos. A expressão gênica não foi avaliada devido a quitosana ter interferido seriamente na atividade da fosfatase alcalina. Assim, a expressão de OCM foi significativamente maior nas células inoculadas nos poços recobertos com gelatina, e não houve diferença na expressão de DSPP e DMP-1 entre os grupos avaliados. Não foi observada mineralização da matriz extracelular das células inoculadas nos poços revestidos com quitosana. A gelatina exibiu menos depósitos de cálcio que ambos os tipos de colágeno. Considerando o conjunto de resultados, os autores concluíram que a quitosana pura parece não ser um ambiente apropriado para a regeneração do complexo dentino-pulpar, sugerindo que provavelmente isso se deva à sua baixa hidrofilicidade. Esses primeiros trabalhos mostram que, apesar da alta biocompatibilidade da quitosana, é necessário desenvolver estratégias para melhorar a adesão e proliferação celular nas matrizes

de quitosana, e assim atingir o objetivo da endodontia regenerativa. Nesse sentido, algumas estratégias têm sido propostas na literatura como alterações no processo de fabricação da matriz ou modificações da sua superfície pela adição de substâncias que favoreçam a adesão e proliferação celular. Guan et al. (2015) propuseram uma nova estratégia para a fabricação de matrizes de quitosana, na qual a quitosana previamente dissolvida em ácido acético foi injetada numa solução de hidróxido de sódio. Com isso, obtiveram-se fibras de quitosana, as quais foram filtradas, centrifugadas, congeladas, neutralizadas em álcool e finalmente secas a temperatura ambiente por dois dias. Seguindo esse método de fabricação proposto, confeccionaram-se matrizes contendo 2% ou 3% de quitosana. A caracterização físico-química das matrizes foi realizada pelo ensaio de inchaço em SFB e pelo ensaio de degradação em lisozima e PBS aos 7, 14 e 21 dias. A caracterização morfológica foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura, a citotoxicidade das matrizes sob SHED e DPSC foi avaliada pelo teste do extrato, a viabilidade das células semeadas sobre as matrizes foi avaliada através do ensaio colorimétrico empregando sal de tetrazólio, e a morfologia celular através de microscopia eletrônica de varredura. Os autores observaram que o tamanho dos poros para as matrizes de 2% e 3% de quitosana foram em média de 188 μm e 190 μm respectivamente. Não houve diferença na degradação de ambas as matrizes, sendo esta inferior a 30% após 21 dias. Ambas as matrizes confeccionadas não foram citotóxicas. A viabilidade celular foi superior nas matrizes de 2% de quitosana para ambos os tipos celulares. As células apresentaram-se aderidas e espalhadas nas matrizes. Os autores concluíram que o método de fabricação das matrizes de quitosana proposto no estudo foi adequado para o crescimento das SHED e das DPSC.

Com o objetivo de melhorar a adesão celular nas matrizes de quitosana, Asghari Sana et al. (2017) propuseram modificar as características de superfície destas matrizes através da adição de RGD ou fibronectina. As matrizes de quitosana foram fabricadas pelo método de congelamento e liofilização, e a modificação de sua superfície com a sequência de peptídeos RGD ou com fibronectina foi realizada através da reação da matriz de quitosana com carbodiimida. A adesão das DPSC nas matrizes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, e a proliferação pelo ensaio colorimétrico PrestoBlue e pela coloração por imunofluorescência do citoesqueleto e núcleo celular. Adicionalmente, o potencial de diferenciação das

DPSC nas matrizes de quitosana modificadas com fibronectina foi avaliado através do método de RT-PCR. Assim, as eletromicrografias obtidas aos 9 dias de cultivo celular mostraram que as DPSC foram capazes de se aderir a superfície da matriz de quitosana em forma de esferas, não sendo capazes de se espalhar e se proliferar. As matrizes modificadas com RGD apresentaram maior número células aderidas, porém, mantendo a forma de esferas. Nas matrizes modificadas com fibronectina, as células se encontraram aderidas e espalhadas cobrindo quase toda a superfície da matriz. A proliferação nas matrizes de quitosana foi diminuindo ao longo dos 9 dias de avaliação, e aos 5, 7 e 9 dias foi significativamente inferior quando comparado com a proliferação nas matrizes modificadas com fibronectina. A diferenciação celular nas matrizes modificadas com fibronectina mostrou uma diminuição na expressão de marcadores odontogênicos entre os 14 e 21 dias. Os autores concluíram que a modificação química da superfície das matrizes de quitosana influencia fortemente na adesão e proliferação celular. Apesar da adição de fibronectina na matriz de quitosana permitir adesão e proliferação celular, esta não resultou na diferenciação odontogênica das células, sugerindo que seria necessária a adição de sinalizadores que promovam a diferenciação celular.

A natureza catiônica da quitosana lhe confere a capacidade endógena de se ligar a fatores de crescimento permitindo sua liberação prolongada. Nesse sentido, Yang et al. (2012) desenvolveram uma matriz porosa a base de quitosana e colágeno funcionalizada com a adição de vetores de plasmídeos que codificam o gene do fator de crescimento BMP-7 através do método de congelamento e liofilização. DPSC foram inoculadas nas matrizes contendo ou não o plasmídeo. A liberação de BMP-7 pelas células transfectadas pelo plasmídeo foi avaliada aos 3, 6, 9, 12, 28 e 24 dias, a proliferação das células nas matrizes foi avaliada aos 1, 4, 8, 16 e 24 dias através do conteúdo de DNA, pela atividade da fosfatase alcalina e o conteúdo de cálcio, a adesão celular nas matrizes foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura aos 4 dias, a expressão gênica de OC, DSPP, BSP e DMP-1 foi avaliada aos 1, 4, 8 e 16 dias através do método de RT-PCR, e para a análise *in vivo*, as matrizes foram inoculadas com DPSC, implantadas no dorso de ratos imunocomprometidos, e após 4 semanas retiradas para análise histológica e imunohistoquímica. Os autores observaram que as DPSC transfectadas liberaram BMP-7 durante os 24 dias de cultivo, alcançando o pico máximo de liberação aos 9

dias. As DPSC inoculadas nas matrizes contendo o plasmídeo mostraram maior proliferação, características morfológicas adequadas, assim como, maior conteúdo de cálcio, maior atividade da fosfatase alcalina e maior expressão de genes odontogênicos que as células inoculadas nas matrizes sem adição do plasmídeo. O estudo *in vivo* demonstrou a presença de células transfectadas após 4 semanas com maior expressão de DSPP quando comparadas com as matrizes puras. Os autores concluíram que a matriz de quitosana e colágeno carregada do plasmídeo de BMP-7 foi eficaz para o transporte e liberação controlada do gene resultando na diferenciação odontogênica das DPSC. Bellamy et al. (2016) propuseram como estratégia a liberação controlada de TGF- β 1 por meio da incorporação de nanopartículas de carboximetil à quitosana e gelatina reticuladas quimicamente com N-hidroxissuccinimida e ácido metanossulfônico. Nesse estudo, as matrizes foram elaboradas pelo método de congelamento e liofilização, e para incorporação do TGF- β 1 nas nanopartículas foi empregado o método de absorção, no qual as nanopartículas são ressuspensas numa solução contendo o fator de crescimento por 12 horas e posteriormente liofilizadas. Assim, a morfologia das matrizes puras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, e sua biodegradação avaliada por meio de uma solução de PBS com lisozima. Adicionalmente, a adesão das SCAP nas matrizes puras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, e a proliferação pelo ensaio de *live/dead* ambas às 24 horas de inoculação. Posteriormente, com o objetivo de avaliar o efeito das matrizes contendo as nanopartículas na diferenciação das SCAP, as matrizes foram imersas em soluções contendo TGF- β 1 livre ou nanopartículas carregadas ou não com TGF- β 1 e imediatamente congeladas e liofilizadas. Esses 3 tipos de matrizes carregadas e a matriz pura foram inoculadas com SCAP e cultivadas por 14 dias. Após esse período, a presença de marcadores odontogênicos foi avaliada pelo ensaio de imunofluorescência para a detecção de DSPP e DMP-1. Os autores constataram que as matrizes puras apresentaram alta porosidade e taxa de degradação de 40% aos 21 dias. As células inoculadas nas matrizes puras apresentaram morfologia espraçadas e viáveis. As células inoculadas nas matrizes contendo nanopartículas carregadas com TGF- β 1 apresentaram expressão significativamente maior de DSPP e DMP-1 que as células inoculadas nas matrizes contendo TGF- β 1 livre. A expressão desses marcadores foi mínima nas células inoculadas nas matrizes puras ou contendo nanopartículas sem TGF- β 1. Os autores concluíram que as matrizes a base de quitosana e gelatina apresentam

potencial para o fornecimento controlado de biomoléculas promovendo a diferenciação celular.

Como exposto, a quitosana apresenta características promissoras para seu emprego na regeneração endodôntica, porém alterações na sua estrutura através de reticulação, combinação com outras substâncias e adição de biomoléculas parecem ser necessárias para melhorar sua interação com as células-tronco.

2.4. BIOMOLÉCULAS DA DENTINA HUMANA E REGENERAÇÃO ENDODÔNTICA

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado secretado pelos odontoblastos durante a dentinogênese e também após a erupção e completa formação do dente, composta por uma matriz mineralizada formada por cristais de hidroxiapatita e pela fração orgânica ou matriz extracelular que compreende as proteínas colágenas e não colágenas (Smith et al., 2012a). Linde (1989) reportaram que a fração mineral da dentina constitui 70% do seu peso e a matriz orgânica constitui aproximadamente 20%, desses, em torno de 90% é composto principalmente por colágeno Tipo I e uma pequena fração de colágeno Tipo III e V; 10% restante é composto por proteínas não colágenas. Jones e Leaver (1974) se propuseram estudar os componentes não colágenos da matriz extracelular da dentina humana. Para isso, pó dentina foi desmineralizado com 10% de EDTA por 8 dias. Então, a parte insolúvel no ácido foi digerida com collagenase durante 4 dias. Assim, os componentes não colágenos foram determinados pela técnica de eletroforese em gel e por focalização isoelétrica. Os autores observaram que a fração não colágena da dentina humana estava composta por glicoproteínas aniônicas, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e peptídeos, embora seja conhecido que a principal fração das proteínas não colágenas nos animais é composta por fosfoproteína e sialoproteína dentinária, identificadas e sequenciadas geneticamente na dentina humana por Gu et al. (1999) e Gu et al. (2000), respectivamente. No entanto, a função dessas duas principais proteínas fossilizadas na dentina humana sobre os processos regenerativos ainda não foi elucidada (Smith et al., 2012a).

Adicionalmente, Thomas e Leaver (1975) identificaram, através do método de desmineralização e digestão com colagenase, a presença de proteínas do plasma, tais como: albumina sérica, transferrina e as imunoglobulinas G, A e M na matriz não colagenosa da dentina humana. A presença de metaloproteinase 2 na forma de zimógeno, precursor enzimático inativo na matriz orgânica da dentina de dentes sadios foi observada por Martin-De Las Heras et al. (2000). Nesse estudo, as proteínas da matriz dentinária foram obtidas da desmineralização do pó de dentina com cloreto de guanidínio por 48 horas, com os resíduos de dentina colocados em solução de 0,5 M de EDTA por 96 horas. Após, os resíduos de dentina foram novamente colocados em cloreto de guanidínio por 72 horas. Em cada etapa da desmineralização, foram coletadas amostras do sobrenadante. Assim, os três extratos coletados foram liofilizados e analisados pela técnica de eletroforese em gel. A detecção de atividade gelatinolítica foi realizada através da técnica da zimografia e Western blotting. Os autores reportaram a presença de metaloproteinase 2 em todos os extratos. Sulkala *et al.* (2002) investigaram a presença de metaloproteinase 20 em pó de dentina obtido de dentes hígidos e com cáries. Para isso, os autores extraíram as proteínas do pó empregando o mesmo método proposto por Martin-De Las Heras *et al.* (2000). Posteriormente, a identificação da molécula foi realizada através da técnica de Western blotting. Os autores reportaram que a metaloproteinase 20 estava presente na dentina sadia mais não na dentina cariada, concluindo que a metaloproteinase incorporada na dentina durante a dentinogênese pode ser liberada durante a progressão de cáries. Mazzoni *et al.* (2007) propuseram determinar a presença de metaloproteinase 2 e 9 no pó de dentina. Para isso, os autores desmineralizaram por 24 horas quantidades iguais de pó de dentina em 4 diferentes tipos de soluções, a saber: ácido acético 0,78 M pH=2,3, ácido cítrico 0,26 M pH=2,3, EDTA 0,5 M pH=6,4 ou EGTA 0,5M pH=6,4. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em *buffer*, e colocadas ou não em cuba ultrassônica por 30 segundos. Após, as proteínas foram precipitadas em sulfato de amônia, centrifugadas e dialisadas. Amostras foram obtidas durante as diversas etapas da extração para sua análise pela técnica da zimografia. Os autores reportaram a presença dos zimógenos da metaloproteinase 2 e 9 nos extratos de ácido cítrico, ácido acético e EDTA. A presença dessas moléculas foi maior após a ultrassonicação. Não houve diferença na quantidade de ambas metaloproteinases entre extrato de ácido cítrico e de ácido

acético. Ambos os extratos apresentaram quantidades significativamente maior de metaloproteinases que o extrato de EDTA.

Os fatores de crescimento são um grupo de proteínas e peptídeos que transmitem sinais entre as células estimulando ou inibindo seu crescimento e modulando sua diferenciação celular. A presença dessas moléculas bioativas tem sido identificada em pequenas quantidades na fração orgânica não colagenosa da matriz dentinária, onde se encontram imobilizadas e protegidas através da sua interação com outras moléculas e pela matriz mineralizada, através do emprego de substâncias ácidas e posterior digestão enzimática (Smith, 2003). Os primeiros fatores de crescimento identificados e quantificados da dentina humana foram reportados por Finkelman et al. (1990). Nesse estudo, os autores desmineralizaram o pó de dentina de dentes humanos em solução de cloridrato de guanidina 4 M contendo inibidores de protease por 4 dias. Posteriormente, as partículas foram dialisadas em solução de cloridrato de guanidina 4 M, EDTA 20 % e inibidores de protease por 28 dias. Após, as amostras foram dessalinizadas por diálise em solução de ácido acético 20 mM por 7 dias. Finalmente, foram centrifugadas, e o sobrenadante foi concentrado por filtração e liofilizado. A concentração total de proteínas nas amostras foi determinada pelo ensaio colorimétrico de ligação na proteína. A presença e quantificação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 foi determinado por radioimunoensaio, e do fator de crescimento esquelético/fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 foi determinado pelo ensaio de radioreceptor e o fator de transformação do crescimento beta foi determinado pelo ensaio biológico. Assim, os fatores de crescimento estudados foram encontrados na dentina nas concentrações de 0,06 ng/μg de IGF-1, 0,52 ng/μg de SGF/IGF-2 e 0,017 de TGF-β. Diante da descoberta desses fatores na matriz orgânica da dentina humana, os autores especularam que esses fatores de crescimento poderiam estimular os odontoblastos a depositar dentina terciária diante o avanço da cárie dental. Bessho et al. (1991) extraíram e purificaram a proteína morfogênica do osso a partir de pó de dentina de dentes humanos recém extraídos. Para isso, o pó foi desmineralizado em ácido clorídrico durante 72 horas. Posteriormente, foi tratado com cloreto de cálcio por 24 horas, seguido de EDTA por 4 horas e finalmente com cloreto de lítio por 24 horas. Após, o pó desmineralizado foi suspenso em cloreto de guanidina por 96 horas. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltrado, dialisado e liofilizado. Posteriormente,

foi purificado por cromatografia líquida. A atividade morfogênica óssea das amostras obtidas durante as etapas do processo de extração foi avaliada através do implante das amostras no músculo de ratos por três semanas. Após, os animais foram sacrificados e área do implante processada para análise histológica e determinação da atividade da fosfatase alcalina. Os autores reportaram que a proteína morfogênica do osso obtida da matriz orgânica da dentina humana possui peso molecular inferior ao extraído da matriz orgânica de outras espécies, e superior ao extraído do osso. A atividade morfogênica óssea foi detectada histologicamente na fração insolúvel em água da matriz orgânica da dentina humana. As outras frações obtidas no processo de purificação não induziram a formação de osso. Os autores concluíram que a proteína morfogênica óssea obtida da matriz orgânica da dentina humana é similar à proteína morfogênica óssea presente no osso, porém sua fração purificada é altamente solúvel *in vivo*, sendo necessário o emprego de uma matriz de transporte para seu uso clínico. Roberts-Clark e Smith (2000) identificaram fatores de crescimento angiogênicos na matriz orgânica da dentina humana. Para isso, os autores desmineralizaram partículas de dentina de 0,5-1 mm em solução de EDTA 10% com inibidores de protease. Posteriormente, o extrato foi dialisado e liofilizado. Os resíduos insolúveis após a extração em EDTA foram lavados e incubados em colagenase ou condroitinase por 7 dias. Após, o extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi dialisado e liofilizado. A presença do fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento do endotélio vascular, fator de crescimento da placenta, fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento epidérmico foi determinada pelo ensaio quantitativo de ELISA para citocinas. Os autores reportaram que na fração solúvel em EDTA foram identificadas grandes quantidades de PDGF-AB em média de 570 pg/ml e quantidades de FGF2, VEGF e PIGF em média de 40, 63, 24 pg/ml respectivamente. A distribuição dos fatores de crescimento foi igual na fração obtida pela colagenase e pela condroitinase. Nessa fração, foi detectada baixa quantidade de PDGF-AB, não foram detectados o FGF2 e PIGF e a concentração de VEGF foi similar à fração solúvel em EDTA. Baixa quantidade de VEGF, em média de 1 pg/ml, foram detectadas em ambas as frações. Os autores concluíram que a matriz orgânica da dentina humana contém fatores de crescimento antigênicos, sugerindo que a liberação desses fatores pode explicar o aumento da antigênese observada nos locais de reparação do complexo dentino-pulpar. Thomson et al. (2013) identificaram a presença do fator de crescimento do

hepatócito através do ensaio de ELISA na fração solúvel em EDTA da matriz orgânica da dentina humana. Adicionalmente, o efeito quimiotático do HGF recombinante em células da polpa dental de ratos foi avaliado pelo ensaio de migração celular no *transwells*, e a proliferação celular e a indução de mineralização na presença do HGF foi avaliada pelo ensaio de WST-1 e pelo ensaio de vermelho de alizarina, respectivamente. Os autores reportaram que o HGF mostrou efeito quimiotático sobre as células. Concentrações de 5 a 20 ng/ml HGF favoreceram a proliferação celular e induziram as células a formar cristais de mineralização em forma dose dependente. Os autores concluíram que HGF é importante para os processos de reparação do complexo dentino-pulpar, destacando seu potencial para recrutar células progenitoras durante a reparação tecidual. Ducan et al. (2017) compararam os fatores de crescimento extraídos por desmineralização da matriz orgânica da dentina humana com EDTA 10% ou com um dos seguintes ácidos orgânicos inibidores de histona de acetilase, a saber: ácido valpróico, tricostatina A ou ácido hidroxâmico suberoilânida. Para isso, pó de dentina de 60 µm de diâmetro foram desmineralizadas com essas soluções por 14 dias em presença de inibidores de protease. Após, os extratos foram dialisados, liofilizados e analisados pela técnica quantitativa de ELISA no formato de sanduíche para a detecção de 40 fatores de crescimento. Os autores reportaram que todos os extratos tinham a presença de fatores de crescimento com atividade neurogênica, a saber: fator neurotrófico derivado do cérebro, receptor do fator de crescimento epidérmico, fator de diferenciação de crescimento 15 e fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial. Além desses fatores, também foram identificados em todos os extratos os seguintes fatores de crescimento: IGFBP-1, IGFBP-2, IGF-1, INS, TGF-β1, HGF, PIGF, PDGFAA, VEGF-A, FGF-7, SCF-R e FGF-2. A liberação de TGF-β1, PDGF-AA, VEGF-A foi significativamente menor nas amostras desmineralizadas com inibidores de histona de acetilase que nas amostras desmineralizadas com EDTA. A liberação de GDF-15, IGF-1, EGFR-1, NGFR, BDNF e SCF-R foi significativamente maior nos extratos de inibidores de histona de acetilase que nos extratos de EDTA. A presença de metaloproteinase-9 foi significativamente maior no extrato de EDTA e de ácido valpróico comparado com o extrato de tricostatina A. Os autores concluíram que os inibidores de histona de acetilase e o EDTA extraem uma ampla gama de fatores de crescimento da matriz orgânica da dentina humana, porém com perfis proteicos diferentes.

Várias propriedades bioativas da dentina têm sido reportadas. Vidair e Butcher (1955) foram os primeiros em reportar a capacidade indutora de dentina para a formação de osso. Nesse estudo, os autores removeram a polpa de dentes de macacos, e realizaram irrigação com formalina 10% após da instrumentação mecânica, e preencheram o terço cervical do canal com guta-percha. Após 74 dias, observaram tecido osteóide ao redor de raspas de dentina provenientes da instrumentação não removidas do interior do canal. Machado (1992) conduziu uma revisão de literatura sobre a capacidade indutora da dentina na formação de tecidos duros. Baseado no reportado pela literatura, o autor concluiu que a dentina pode induzir a neoformação de cartilagem ou osso, e que essa habilidade é influenciada pela origem, pelo processo de descalcificação e pela área de implantação da dentina. No que se refere ao tratamento endodôntico, o autor reportou que o emprego de raspas de dentina como tampão apical na obturação de canais radiculares parece não interferir com o processo de reparação apical. Assim, o autor sugere que o uso de dentina adequadamente tratada, liofilizada, esterilizada e em forma de geleia poderia apresentar resultados favoráveis na terapia endodôntica. A capacidade de osteoindução da dentina humana foi avaliada por Machado et al. (2006). Nesse estudo, fragmentos de dentina humana foram desmineralizados com ácido clorídrico 0,6 mols/l por 48 horas. Após esse período os fragmentos foram lavados com abundante solução salina e finalmente esterilizados com óxido de etileno. Posteriormente, os fragmentos foram implantados no musculo de ratos. Adicionalmente, também foram implantados fragmentos de dentina não desmineralizados nem esterilizados, e osso liofilizado previamente reidratado com solução salina. Após 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias, os animais foram sacrificados e a área dos implantes foi retirada para seu processamento e análise histológica pela coloração com hematoxilina e eosina e tricômio de Masson. Os autores reportaram que os fragmentos de dentina desmineralizados e esterilizados após 180 dias foram reabsorvidos e substituídos por tecido conectivo rico em fibroblastos sem sinais de inflamação e com áreas sugestivas de calcificação. Os fragmentos de dentina sem tratamento prévio após 180 dias se encontravam rodeados por numerosas células inflamatórias. O osso liofilizado apresentou sinais de calcificação aos 180 dias. Os autores concluíram que a dentina humana esterilizada apresenta capacidade osteoindutora sugerindo que essa capacidade se deve aos componentes da matriz orgânica da dentina humana.

No que se refere à reparação do complexo dentino-pulpar, Smith et al. (1990) propuseram avaliar a capacidade dentinogênica reparadora das proteínas não colagenosas contidas na matriz orgânica da matriz dentinária. Para tal, a fração solúvel em EDTA foi obtida após desmineralização de pó de dentina de dentes de coelho numa solução de EDTA 10% contendo inibidores de protease por 7 dias. Após, o sobrenadante foi coletado, dialisado por vários dias e finalmente liofilizado. Os resíduos insolúveis em EDTA foram coletados e lavados com água destilada. Posteriormente, as proteínas foram extraídas por digestão com colagenase por 5 dias. A cada dia, o sobrenadante foi coletado, centrifugado, dialisado e finalmente liofilizado. Ambas as frações liofilizadas foram implantadas em contato direto com a polpa em cavidades realizadas em dentes furões. Após 14 e 28 dias, os dentes foram processados para análise histológica pela coloração com hematoxilina e eosina. Os autores observaram evidência de dentina tubular ao longo das paredes da exposição e no fundo da cavidade. Presença de colunas de células semelhantes a odontoblastos foi observada segregando dentina tubular em direta associação com a dentina da cavidade. Os autores concluíram que as proteínas não colagenosas da matriz dentinária apresentam propriedades morfogênicas evidenciadas pela neoformação *in vivo* de dentina reparativa. Posteriormente, com o objetivo de avaliar a influência do substrato na imobilização das proteínas não colágenas da matriz orgânica da dentina, Smith et al. (1995) implantaram membranas de nitrocelulose ou a base de celulose nitrato acetado (Millipore) em cavidades realizadas em dentes furões. Previamente, as membranas foram imersas em extrato de proteínas solúveis e não solúveis em EDTA obtidas pelo método proposto por Smith et al. (1990). Após 14 e 28 dias, os animais foram sacrificados, e os dentes processados para análise histológica pela coloração com hematoxilina e eosina. Os autores não observaram evidências de reparação em nenhum dos tempos experimentais para ambas as membranas. Quando foram empregadas membranas de nitrocelulose, observaram-se áreas de reabsorção dentinária associadas com células gigantes multinucleadas e células semelhantes aos osteoclastos, além de áreas de inflamação, características de reação de corpo estranho. As membranas a base de celulose nitrato acetado não apresentaram sinais de reabsorção ou inflamação nem reação de corpo estranho. Os autores concluíram que a existência da fração insolúvel da dentina é importante durante a formação de dentina reparadora servindo de substrato para a imobilização

e potenciação da atividade dos fatores crescimento presente no extrato da fração orgânica da dentina.

Salehi et al. (2016) avaliaram o efeito dos extratos da matriz orgânica da dentina humana na proliferação e na mineralização de células indiferenciadas da polpa dental e de células semelhantes aos odontoblastos de camundongos. Para tal, partículas de dentina humana foram desmineralizadas com EDTA ou ácido fosfórico com diferentes pH, a saber: 1,3 e 5 por 7 dias. Posteriormente, o extrato foi dialisado e liofilizado. O efeito do meio condicionado pelos extratos na concentração de 0,01, 0,1, 1 e 10 µg/ml sobre a proliferação celular foi avaliado aos 3, 5 e 7 dias pelo ensaio de Alamar Blue, e a formação de cristais de mineralização pelas células aos 14 dias foi avaliado pela coloração com vermelho de alizarina. Os autores reportaram que tanto a proliferação como a mineralização de ambas as linhagens celulares quando cultivadas com os extratos de EDTA e de ácido fosfórico pH=3, 5 e 7 numa concentração de 10 µg/ml foi significativamente maior que quando cultivadas no meio sem adição do extrato. Os autores concluíram que as proteínas da matriz orgânica da dentina podem ser liberadas por diferentes ácidos com diferentes pH, sugerindo que essas moléculas liberadas poderiam contribuir com o processo de reparação do dente. Recentemente, o efeito da combinação de lipopolissacarídeo com extrato de proteínas solúveis em EDTA da matriz orgânica da dentina humana foi avaliado por Widbiller *et al.* (2018c). Para tal, as células-tronco foram cultivadas em meio suplementado com diferentes concentrações de lipopolissacarídeo ou de extrato ou com a combinação de ambos. O extrato foi obtido pelo método proposto previamente por Widbiller *et al.* (2018a) na resposta inflamatória e na regeneração de células-tronco da polpa dentaria. A vitalidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT aos 1, 2 e 7 dias. A expressão de marcadores de mineralização foi avaliada através de RT-PCR aos 2 e 21 dias. Os autores reportaram que o lipopolissacarídeo não interfere com a viabilidade das células, porém interfere na expressão de marcadores odontoblásticos. A resposta inflamatória foi avaliada através da secreção de interleucina-6 quantificada pelo teste de ELISA em 24 horas e aos 7 dias. Os autores constataram que o lipopolissacarídeo causa aumento da produção de interleucina-6 aos 7 dias. Além disso, o extrato produziu aumento da citocina em 24 horas, porém voltando aos níveis basais aos 7 dias. A associação de lipopolissacarídeo ao extrato resultou no aumento da citocina em 24 horas, porém aos 7 dias o extrato impediu a secreção da citocina induzida pela

lipopolissacarídeo. Os autores concluíram que as proteínas da matriz orgânica da dentina atenuam o impacto negativo do lipopolissacarídeo nas células, desempenhando assim, um papel importante para a reparação natural do complexo dentino-pulpar.

Além das propriedades bioativas dos extratos da matriz orgânica da dentina humana, Smith et al. (2012b) reportaram que os componentes desta apresentam atividade antimicrobiana. Nesse estudo, os autores desmineralizaram pó de dentina humana com partículas inferiores a 60 µm em solução de EDTA 10% com inibidores de protease por 14 dias. Posteriormente, o extrato obtido foi dialisado, liofilizado, e solubilizado em soluções de sulfato de amônia 30, 50, 70 ou 90 % resultando na precipitação das proteínas. Após centrifugação dos novos extratos, o *pellet* obtido foi dialisado em água e liofilizado, resultando na obtenção de 4 diferentes frações proteicas da matriz. A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi avaliada sobre as cepas bacterianas de *S. mutans*, *S. oralis* e *E. faecalis*. Para isso, diferentes quantidades dos extratos liofilizados foram acrescidas a 100 µl de TSB contendo individualmente cada cepa bacteriana na concentração de 2×10^5 UFC/ml. O crescimento bacteriano após 24 horas foi avaliado pela turbidez do meio medida a 570 nm em espectrofotômetro. Adicionalmente, para determinar se o efeito dos extratos era bacteriostático ou bactericida, após 24 horas de cultura nas soluções contendo os extratos, as bactérias foram isoladas por centrifugação, ressuspensas em TSB não suplementado com os extratos e cultivadas por mais 24 horas. Posteriormente, a quantidade de bactéria foi determinada pela turbidez do meio. Ainda, a citotoxicidade dos extratos foi testada sobre células da polpa dental de ratos, determinada pela absorbância do meio após 48 horas de cultura celular em meio acrescido com diferentes concentrações dos extratos liofilizados. Os autores reportaram que concentrações de 1,5 e 10 µg/ml dos extratos reduziram o crescimento bacteriano de todas as cepas testadas, sendo a redução do crescimento de *S. mutans* estatisticamente significativa. Todas as frações obtidas após precipitação das proteínas com sulfato de amônia apresentaram redução significativa do crescimento bacteriano quando comparada ao crescimento no meio não suplementado para todas as cepas bacterianas avaliadas. Crescimento bacteriano foi observado após suspensão das bactérias em TSB não suplementado, o que sugere que os extratos testados apresentam efeito bacteriostático em vez de bactericida. Não foi observado

efeito citotóxico das concentrações do extrato que previamente apresentaram atividade antimicrobiana. Os autores concluíram que a matriz orgânica da dentina humana apresenta atividade bacteriostática, sugerindo que essa atividade pode ocorrer devido à presença de peptídeos antimicrobianos naturais como a adrenomedulina presente na matriz orgânica da dentina, e que a liberação dessas moléculas pode contribuir com as respostas de defesa do complexo dentino-pulpar frente a um agente agressor como a cárie.

No que se refere à regeneração endodôntica, Galler et al. (2011b) propuseram avaliar a influência do pré condicionamento da dentina no comportamento celular. Para isso, foram implantados no tecido subcutâneo de ratos imunossuprimidos, cilindros de dentina com diferentes tratamentos, a saber: tratados com hipoclorito de sódio 5,25% e preenchidos com hidrogel a base de peptídeos de automontagem, tratados com hipoclorito de sódio e preenchidos com hidrogel carregado com células-tronco da polpa dental e com VEGF, TGF- β 1 e FGF2, ou tratados com hipoclorito de sódio seguido de irrigação com final com EDTA 17% e preenchido com hidrogel carregado das mesmas células-tronco e fatores de crescimento. Após 6 semanas, os animais foram sacrificados e os implantes retirados para sua análise histológica pela coloração de hematoxilina e eosina e tricoma de Masson, e pela marcação imunohistoquímica para a detecção de fosfatase ácido resistente ao tartarato e de DSP. Os autores reportaram que no cilindro preenchido somente com o hidrogel não foi observada migração celular no seu interior. Contrariamente, o interior do cilindro estava preenchido por tecido conjuntivo vascularizado com presença de células semelhantes aos fibroblastos nos grupos onde o hidrogel foi carregado com células-tronco. Os grupos onde o cilindro foi tratado somente com hipoclorito de sódio, as células em contato com a dentina apresentaram um fenótipo semelhante aos odontoclastos, observando-se áreas de reabsorção. Nos cilindros onde foi empregada a irrigação adicional com EDTA, as células encontravam-se em íntimo contato com a dentina apresentando um fenótipo semelhante aos odontoblastos. Os autores concluíram que o condicionamento dentinário influencia no fenótipo das células-tronco, sugerindo o emprego de EDTA como irrigação final nos protocolos de regeneração. Posteriormente, Galler et al. (2015) compararam a liberação de TGF- β 1, VGF-2 e VGEF em cilindros de dentina após da irrigação com diferentes substâncias desinfetantes e preenchimento com várias medicações intracanaís propostas nos

protocolos de revascularização endodôntica. Os autores reportaram que o emprego de hipoclorito de sódio ou de antibióticos reduz a liberação de fatores de crescimento, e o emprego de EDTA ou de hidróxido de cálcio aumenta a liberação desses fatores. A clorexidina empregada como irrigação ou como medicação não afetou a liberação de fatores da matriz orgânica dos cilindros de dentina. Os autores concluíram que o emprego de soluções e medicações pode atenuar ou amplificar a liberação dos fatores de crescimento contidos na matriz orgânica da dentina humana. Widbiller et al. (2017) avaliaram o efeito da ativação ultrassônica dos irrigantes na liberação de TGF- β 1 da matriz orgânica da dentina. Para isso, discos de dentina humana e canais de dentes humanos instrumentados foram irrigados com EDTA 17% ou PBS em agitação ultrassônica ou não. Após, as soluções de irrigação foram coletadas, e a quantidade de TGF β -1 presente foi determinada pela técnica de ELISA. Os autores reportaram que tanto os discos como os canais irrigados com PBS não liberaram TGF β -1 mesmo com ativação ultrassônica. No entanto, em ambos, a irrigação com EDTA resultou na liberação de TGF β -1, sendo esta liberação aumentada após ativação ultrassônica. Foi possível detectar a presença do fator de crescimento no PBS empregado como irrigação final após do condicionamento do canal com EDTA ativado com ultrassom. O maior valor de TGF β -1 detectado no canal radicular foi no grupo irrigado com EDTA por 3 minutos com ativação ultrassônica. Os autores concluíram que a liberação de fatores de crescimento da matriz orgânica da dentina humana é aumentada pela ativação ultrassônica do EDTA.

A capacidade angiogênica dos componentes da matriz orgânica da dentina humana foi avaliada por Zhang et al. (2011). Para tal, pó de dentina foi desmineralizada por 7 dias numa solução de EDTA 10% com inibidores de protease. Após, o extrato foi dialisado em água destilada e liofilizado. Posteriormente, o efeito angiogênico do extrato liofilizado em concentrações de 0,0001 mg/ml a 5 mg/ml foi avaliado sobre a cocultura de células endoteliais e células intersticiais. Como controle positivo foi empregado VEGF recombinante. Após 9 dias de cultura, a formação de capilares foi visualizada pela marcação imunohistoquímica para marcador endotelial CD31 e fator de von Willebrand. O efeito do extrato nas concentrações de 0,0001 mg/ml a 1 mg/ml sobre a proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana foi avaliado durante 8 dias pela contagem celular diária com azul de tripam em comparação com a proliferação celular na ausência do extrato. A expressão gênica

de VEGF e VEGF-R2 nas células cultivadas com ou sem o extrato foi determinada pelo método semi-quantitativo de PCR. Os autores observaram que concentrações do extrato inferiores a 0,01 mg/ml promoveram a angiogênese, ao contrário, as concentrações superiores a 0,1 mg/ml do extrato apresentaram um efeito inibitório. O mesmo efeito foi observado na expressão gênica das células cultivadas. A proliferação das células foi estimulada por concentrações inferiores a 0,1 mg/ml do extrato e inibidas nas concentrações superiores a 1 mg/ml. Os autores concluíram que o efeito pró-angiogênico das proteínas da matriz orgânica da dentina humana é dose dependente sugerindo que na dose adequada, essas biomoléculas podem favorecer a revascularização na regeneração pulpar.

Diante da possibilidade de liberação das biomoléculas pela ação dos ácidos da cárie ou ação de substâncias e medicamentos empregados na terapia endodôntica regenerativa, Aubeux et al. (2016) se propuseram investigar a capacidade da matriz em forma de hidrogel a base de hidroxipropilmetilcelulose silatada na liberação de proteínas do pó de dentina. Primeiramente, os autores avaliaram o efeito do tamanho da partícula de pó de dentina na liberação de proteínas. Para isso, fatias de dentina humana foram moídas num moinho de zircônia para obter dois tamanhos de partículas de pó diferentes, a saber: maior de 50 μm e menor de 50 μm . Posteriormente, os pós obtidos foram suspensos individualmente numa solução de EDTA 10% com inibidores de protease por 12 dias. O sobrenadante foi coletado a cada dia, e a quantidade de proteínas liberadas na solução foi determinada pelo ensaio de proteínas totais. Nessa primeira parte do estudo, os autores observaram que a liberação de proteínas foi maior nas primeiras 24 horas diminuindo com o decorrer do tempo. O pó de dentina com partículas menores de 50 μm liberou em média de 189,1 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas, e o pó de dentina com partículas maiores a 50 μm liberou em média de 144.5 $\mu\text{g/ml}$ observando uma correlação entre o tamanho da partícula e a quantidade de proteínas liberadas na solução. Assim, concluíram que quanto mais fino for o pó maior quantidade de proteínas é liberada. Na segunda parte do estudo, os autores avaliaram a liberação de proteínas de matrizes de hidroxipropilmetilcelulose silatada com diferentes concentrações de pó de dentina com tamanho inferior a 50 μm , a saber: 50, 100 e 150 mg/ml variando o tempo da reticulação, a ordem de incorporação dos elementos e o pH inicial da matriz. Assim obtiveram doze diferentes matrizes, as quais foram colocadas em PBS por 30 dias. A

quantidade de proteínas liberadas pelas matrizes na solução de PBS foi avaliada em 1, 2, 7, 14, e 30 dias pelo ensaio de proteínas totais. Nessa segunda parte do estudo, os autores observaram que a matriz composta por 150 mg/ml de pó de dentina sem adição de *buffer* ácido liberou uma quantidade significativamente maior de proteínas que as outras composições avaliadas, sendo a maior concentração atingida aos 30 dias em média de 198,6 µg/ml de proteínas. Assim, nessa segunda parte do estudo, os autores concluíram o pH ácido da matriz permitiu a sua reticulação com o pó de dentina e a liberação de proteínas, quanto maior a quantidade de pó incorporado na matriz maior foi a liberação de proteínas. Na terceira parte do estudo, os autores avaliaram pelo ensaio de ELISA a liberação de TGFβ-1 na sua forma ativa e inativa de matrizes contendo 150 mg de pó de dentina em 1, 3, 5 e 14 dias. Os autores observaram que a matriz foi capaz de liberar ambas as formas de TGFβ-1 contido no pó de dentina, onde essa liberação começou desde o primeiro dia e foi maior aos 14 dias com média de 98.81 pg/ml. A quantidade de TGFβ-1 representou o 0,03% do total de proteínas liberadas pela matriz. Assim, os autores concluíram que a matriz a base de hidroxipropilmetilcelulose silatada foi capaz de extrair as proteínas da matriz orgânica do pó de dentina.

Widbiller et al. (2018a) propuseram um novo método para extrair e concentrar as proteínas da matriz orgânica da dentina, e avaliaram o efeito do extrato obtido sobre o comportamento de células-tronco da polpa dental. O método proposto no estudo consistiu em desmineralizar pó de dentina em uma solução de EDTA 10% por 30 minutos em rotação constante. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado, filtrado, e as proteínas solúveis no EDTA foram concentradas por centrifugação e suspensas em PBS. O procedimento de centrifugação e ressuspensão em PBS foram repetidos várias vezes para substituir o EDTA pelo PBS no extrato final. O extrato obtido foi caracterizado pelo ensaio de proteínas totais através da reação com o ácido bicinonínico e a quantidade de TGFβ-1, BMP-2 e VEGF foram determinadas pela técnica de ELISA. Posteriormente, o efeito do meio condicionado com o extrato sobre a viabilidade das células-tronco foi avaliado em 1, 3, 4, 5, 7, 14 e 21 dias através do ensaio de MTT, e a proliferação pelo ensaio de CyQuanta. A apoptose celular foi determinada por citometria de fluxo. O efeito quimiotáxico do extrato sobre as células foi avaliado pelo ensaio de câmara de Boyden. A expressão gênica odontoblástica das células cultivadas com o extrato foi avaliado por RC-PCR, e a capacidade de

indução de mineralização foi avaliada pelo ensaio de coloração com vermelho de alizarina. Para todos os testes, foi empregado meio condicionado com TGF β -1 recombinante e meio acrescido com 1% de SBF como comparação. Os autores reportaram que o extrato obtido no estudo apresentou quantidade de proteínas no intervalo de 3000 a 4100 $\mu\text{g/ml}$ com quantidades de TGF β -1, BMP-2 e VEGF em média de 16,3, 0,2 e 0,1 pg/ml respectivamente. Concentrações altas de 1000 e 500 pg/ml de TGF β -1 no extrato apresentaram efeito anti-proliferativo sem afetar a viabilidade celular. Concentrações inferiores a 200 pg/ml de TGF β -1 no extrato não afetaram significativamente a proliferação celular quando comparado com os controles. O efeito apoptótico do extrato sobre as células não foi significativo para todas as concentrações testadas. Concentrações de 10 pg/ml de TGF β -1 no extrato não apresentaram efeito quimiotático, porém concentrações altas de 1000 pg/ml de TGF β -1 apresentaram efeito quimiotático sem diferença significativa com a mesma concentração de TGF β -1 recombinante. As células-troncos cultivadas no meio condicionado com o extrato apresentaram expressão gênica positiva para DSPP, DMP-1, OPM e COM, além de apresentar sinais de calcificação. Os autores concluíram que o extrato das proteínas solúveis em EDTA da matriz orgânica da dentina estimula a quimiotaxia, diferenciação e mineralização das células-tronco da polpa dental sem afetar sua viabilidade. Diante desses resultados, Galler et al. (2018) avaliaram o efeito da adição de extrato desenvolvido por Widbiller et al. (2018a) com concentração de 500 pg/ml de TGF β -1 em quatro diferentes tipos de matrizes em forma de hidrogel a base de fibrina, polietilenoglicol de cura química ou fotopolimerizável ou de peptídeo de automontagem modificado na neoformação tecidual. Para isso, cilindros de dentina foram preenchidos com as matrizes carregadas com células-tronco da polpa dental, misturadas ou não com o extrato. Posteriormente, os cilindros foram implantados no dorso de ratos imunossuprimidos. Após 4 semanas os animais foram sacrificados e os cilindros retirados para sua análise histológica e imunohistoquímica. Os autores reportaram que dos materiais testados, somente na matriz a base de fibrina associada ao extrato de proteínas da matriz orgânica da dentina humana foi observada a formação de tecido conjuntivo similar à polpa dentaria, com percentual de 83% dos cilindros desse grupo. Ao contrário, quando a mesma matriz não foi associada com o extrato, os cilindros foram preenchidos pelos restos da matriz e poucas células esferoidais. Os cilindros preenchidos com os outros tipos de matrizes apresentaram-se vazios ou preenchidos

por tecido conjuntivo frouxo com células dispersas. Os autores sugeriram que a capacidade endógena da fibrina em se ligar e liberar controladamente fatores de crescimento, poderia ter resultado na associação adequada da matriz com o extrato, e assim, ambos ter contribuído para a formação do tecido similar a polpa dentária no interior dos cilindros. Widbiller et al. (2018b) avaliaram *in vivo* o efeito quimiotático da associação de quatro tipos diferentes de matrizes - fibrina, selante de fibrina, plasma rico em fator de crescimento e peptídeo de automontagem - com extrato da fração solúvel em EDTA da matriz orgânica da dentina humana obtido pelo método proposto por Widbiller et al. (2018a). Para tal, o canal radicular de dentes humanos recém-extraídos foi preenchido por um dos tipos de matriz associada com o extrato e prévio condicionamento radicular com EDTA 10%. Após a gelificação das matrizes, o ápice radicular foi coberto com colágeno em gel contendo DPSC, e imediatamente, o dente foi implantado no dorso de ratos imunossuprimidos. Como grupo controle as raízes foram preenchidas pelas matrizes sem adição do extrato. Após 4 semanas, os dentes implantados foram extraídos para a análise histológica e imunohistoquímica do tecido intrarradicular formado. Os autores observaram que a associação das matrizes com o extrato proteico resultou em maior crescimento de tecido intrarradicular com presença de células diferenciadas aderidas à parede dentinária. A análise imunohistoquímica confirmou que a origem humana dessas células. O hidrogel de plasma rico em fatores de crescimento associado ao extrato proteico permitiu maior crescimento de tecido intrarradicular, e o peptídeo de automontagem produziu o menor crescimento tecidual. Contudo, nenhum dos grupos avaliados apresentou frequências acima de 50% de canais completamente preenchidos por tecido neoformado. Os autores concluíram que a associação de matrizes a base de fibrina ou seus derivados com o extrato das proteínas solúveis em EDTA da matriz orgânica da dentina humana induz a migração celular e a neoformação tecidual.

Assim, pode-se afirmar que a dentina é uma fonte de numerosas moléculas com propriedades bioativas, as quais podem ser extraídas e empregadas em prol da regeneração endodôntica. Contudo, é necessário o desenvolvimento de matrizes que possam imobilizar e liberar controladamente essas biomolécula

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e analisar as características morfológicas, físico-químicas, biológicas e antimicrobianas das matrizes a base de quitosana e suas associações, tais como a adição de gelatina, a reticulação com genipina e a adição de dentina em pó.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Quitosana de baixo peso molecular com grau de desacetilação do 85% (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América);

Genipina (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América);

Gelatina de pele bovina tipo B (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América);

Caldo de cultivo microbiológico BHI (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América);

Dexametasona (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América);

Ácido acético glacial pró-análise 85% (Dinâmica, São Paulo, Brasil);

Álcool etílico anidro (Dinâmica, São Paulo, Brasil);

Soro fisiológico esterilizado - 0.9% Cloreto de Sódio (Cirúrgica São Paulo, São Paulo, Brasil);

Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América);

Meio mínimo essencial (GIBCO/Life Technologies, Nova Iorque, Estados unidos da América);

Soro fetal bovino (Hyclone, Utah, EUA)

L-glutamina (GIBCO/Life Technologies, Nova Iorque, Estados unidos da América);

Penicilina (GIBCO/Life Technologies, Nova Iorque, Estados unidos da América);

Estreptomomicina (GIBCO/Life Technologies, Nova Iorque, Estados unidos da América);

PBSA suplementado com 4% de antibiótico - penicilina (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, EUA)

Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados unidos da América)

StemProAccutase (GIBCO/Life Technologies, Nova Iorque, Estados Unidos da América);

CD105-FITC (BD Biosciences, Califórnia, Estados Unidos da América)

CD29-APC (BD Biosciences, Califórnia, Estados Unidos da América)

STRO-1- FITC (Biolegend, Califórnia, Estados Unidos da América)

CD45- APC (Biolegend, Califórnia, Estados Unidos da América)

CD14-PE (BDBiosciences, Califórnia, Estados Unidos da América)

Cuba ultrassônica (Branson®®, Danbury, Estados Unidos da América);

Liofilizador- Benchtop 4K (Virtir®, Nova Iorque, Estados Unidos da América);

Cortadora automática-Isomet® 1000 (Buelher, Illinois, Estados Unidos da América);

Moinho de bolas automático-MM400 (Retsch, Pensilvânia, Estados Unidos da América);

Granulômetro por difração a laser-Helos (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Alemanha);

Peneira granulométrica de malha nº 400 (Bronzinox, São Paulo, Brasil);

Misturador de bancada-RW20 (IKA, Hong Kong, China);

Espectrofotômetro DU 800 (Beckman® Coulter, Califórnia, Estados Unidos da América);

Microscópio eletrônico de varredura-5300 (Jeol®, Massachusetts, Estados Unidos da América)

Citômetro de fluxo-FACSCalibur (Becton Dickinson, Califórnia, Estados Unidos da América)

Broca trefina N°10 e 5 (WF, São Paulo, Brasil);

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Atendimento às normas de bioética

Primeiramente, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP), e após sua aprovação com parecer número 2.745.544, foram coletados 19 terceiros molares inclusos com apicigênese completa e 3 terceiros molares inclusos com apicigênese incompleta de pacientes entre 18 e 28 anos. Estes dentes foram extraídos na clínica da disciplina de Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por motivos ortodônticos ou preventivos. Todos os dentes foram doados voluntariamente logo após da extração, com prévia assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A).

4.2.2 Preparo das matrizes tridimensionais porosas

Todas as etapas do preparo das diferentes matrizes foram realizadas nos laboratórios da Biologia Oral, bem como no Centro de Pesquisa em Bioquímica Oral, ambos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.2.2.1 *Matrizes solidas a base de quitosana*

Uma solução de quitosana 2% p/v foi preparada a partir da dissolução de 2 g de quitosana de baixo peso molecular e com grau de desacetilação de 85% em 100 ml de ácido acético 1% v/v, sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24

horas. A solução resultante foi colocada em tubos de micro centrifugação de 1,5 ml, empregado como moldes para obter matrizes cilíndricas. Posteriormente, os tubos foram colocados em cuba ultrassônica por 10 minutos, e rapidamente transferidos à -20 °C em um congelador por 12 horas, sendo então, transferidos à -80 °C por mais 12 horas, e posteriormente liofilizados por 48 horas. Assim, as matrizes cilíndricas obtidas foram neutralizadas em álcool etílico anidro por 12 horas, e novamente, congeladas à -20 °C por 12 horas, e então, a -80°C por mais 8 horas, e finalmente liofilizadas por 48 horas.

4.2.2.2 *Matrizes solidas a base de quitosana e gelatina*

A solução de quitosana 2% p/v foi preparada como descrito no item 4.2.2.1. Adicionalmente, a solução de gelatina 4% p/v foi preparada através da sua dissolução de 4 g em água ultrapura sob agitação magnética e aquecimento a 40°C durante 1 hora. Posteriormente, as duas soluções foram misturadas na proporção Q/G 1:1 sob agitação magnética e aquecimento a 40°C durante 2 horas, resultando em uma solução de concentração final de quitosana 1% p/v e de gelatina 2% p/v. Essa solução foi colocada em moldes cilíndricos, que foi posteriormente, colocados em cuba ultrassônica, e as matrizes congeladas, liofilizadas, neutralizadas e novamente liofilizadas, seguindo os mesmos parâmetros que foram descritos para as matrizes de quitosana no item 4.2.2.1.

4.2.2.3 *Matrizes solidas a base de quitosana, gelatina e dentina em pó*

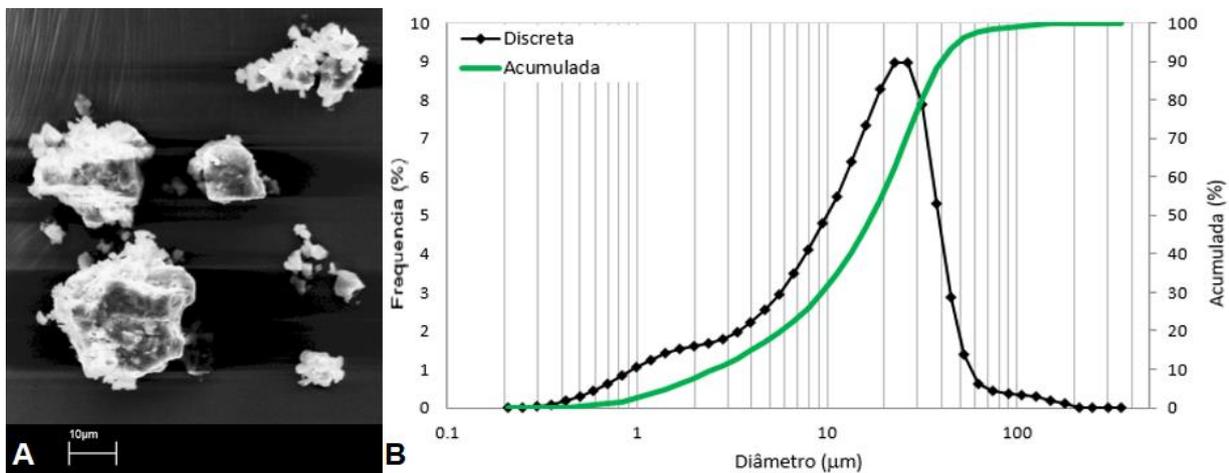
4.2.2.3.1 *Preparo do pó de dentina*

Para o preparo do pó de dentina, as coroas de 19 dentes com apicigênese completa foram utilizados. Imediatamente após a extração, a porção coronária do dente foi separada da raiz com o auxílio de broca tronco cônica acionada em alta rotação sob refrigeração. Posteriormente, os restos de tecido pulpar da câmara foram retirados com curetas periodontais, e o esmalte foi removido com broca tronco cônica acionada em alta rotação sob refrigeração. Após, as coroas foram colocados em soro fisiológico esterilizado e armazenados por um período máximo de 30 dias a -80°C . Após descongelamento, os dentes foram seccionados em fatias de 0,8 mm de espessura na cortadora automática Isomet sob refrigeração. Posteriormente, 6 g de fatias de dentina foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em um moinho de bolas automático por 6 ciclos de 2 minutos cada, a 30 HZ. Finalmente, o pó obtido foi peneirado em um tamis de malha n° 400 e armazenado a -80°C .

A distribuição de tamanho das partículas de dentina obtidas foi determinada no granulômetro por difração a laser com faixa de detecção 0,1 a 350 micra. Para isso, 0,15 g do pó de dentina foi adicionado em béquer e, em seguida, misturado com 50 ml de água, utilizando-se um misturador de bancada com rotação mantida em 1000 rpm durante 1 minuto. A suspensão foi transferida para o reservatório de análise, aplicando ultrassom por 2 minutos, e logo, iniciada a avaliação. Este ensaio foi realizado em três amostras obtidas em moagens diferentes com o objetivo de validar a reprodutibilidade do método de obtenção do pó de dentina. O ensaio de granulometria por difração a laser foi realizado no laboratório de microestrutura e ecoeficiência de materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

A análise granulométrica do pó preparado foi realizada, demonstrando partículas com diâmetros entre 0,3 e 53 μm , sendo 90% com tamanho inferior a 40 μm , e 50% com tamanho inferior a 17 μm (Figura 4.1).

Figura 4.1 – (A) Eletromicrografia e (B) distribuição granulométrica do pó de dentina



Fonte: O autor

4.2.2.3.2 *Desenvolvimento da matriz sólida a base de quitosana, gelatina e dentina em pó*

Pó de dentina foi adicionado numa solução de ácido acético 1%. A solução foi mantida em cuba ultrassônica por 4 horas em constante agitação utilizando um misturador de bancada. Posteriormente, a quitosana foi adicionada em agitação magnética, e a solução mantida assim por 24 horas. Finalizado esta etapa, foram adicionadas uma solução de gelatina, e misturadas em agitação magnética e aquecimento a 37°C por 2 horas. Posteriormente, a solução final composta por quitosana 1% p/v, gelatina 10% p/v e dentina em pó 15% p/v foi colocada em moldes cilíndricos, ultrassonicada, congelada, liofilizada, neutralizada e novamente liofilizada seguindo os mesmos parâmetros que foram descritos para as matrizes de quitosana no item 4.2.2.1.

4.2.2.4 *Desenvolvimento de matrizes solidas reticuladas quimicamente*

A reticulação química das matrizes foi realizada através da adição de genipina diretamente nas soluções de quitosana-gelatina e quitosana-gelatina-pó numa concentração de 0,15% p/v. Assim, a genipina foi adicionada após finalizado o processo de mistura das diferentes soluções. Posteriormente, a solução contendo genipina foi mantida em agitação constante e aquecimento a 37°C por duas horas. Após, foram congeladas, liofilizadas, neutralizadas e finalmente novamente liofilizadas seguindo os mesmos parâmetros que foram descritos para as matrizes de quitosana no item 4.2.2.1.

4.2.3 Caracterização morfológica das matrizes solidas

As matrizes desenvolvidas foram congeladas em nitrogênio líquido, clivadas transversalmente, fixadas num suporte de alumínio com fita adesiva metálica condutora, revestidas com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro (30ma, 100 segundos, vácuo 10⁻²) e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura no laboratório da Biologia Oral da Faculdade de Odontologia ou no Instituto de Química, ambos da Universidade de São Paulo. Assim, foram obtidas eletromicrografias a 75X e 150x. As eletromicrografias obtidas a 75X foram analisadas empregando o software ImageJ para determinar o diâmetro dos poros das matrizes. As Eletromicrografias obtidas a 150X foram empregadas para a análise da rugosidade da superfície das matrizes. Estas análises foram realizadas em quatro matrizes por grupo, elaboradas em tempos diferentes com o objetivo de validar a reprodutibilidade do tamanho dos poros obtidos pelo método de elaboração proposto.

4.2.4 Caracterização físico-química

Todos os ensaios referentes à caracterização físico-química foram realizados sobre quatro matrizes elaboradas em tempos diferentes. O tamanho das matrizes foi padronizado com o auxílio de uma broca trefina de 10 mm de diâmetro. A broca foi acionada em baixa rotação após congelamento das matrizes em nitrogênio. Assim todas as matrizes empregadas nesta fase tiveram um tamanho de 5 mm de altura x 8 mm de diâmetro.

4.2.4.1 *Ensaio de degradação*

As diferentes matrizes foram pesadas (P_o) numa balança analítica eletrônica de precisão, e colocadas individualmente em microtubos de centrifugação de 5 ml contendo 2,144 ml de SBF (pH=7,4), e mantidas a 37°C por 2, 8, 16, 24 e 32 dias, sendo uma concentração de 1,5 µg/mL de lisozima acrescentada diariamente na solução de SBF. Após, transcorridos esses períodos, as matrizes foram retiradas, secadas cuidadosamente com papel filtro, liofilizadas e posteriormente novamente pesadas (P_t). A taxa de degradação das matrizes foi expressa pela porcentagem da perda de peso a cada intervalo de tempo (D%) empregando-se a seguinte fórmula (Nieto-Suarez et al., 2016):

$$D\% = P_o - P_t / P_o \times 100$$

O SBF foi preparado de acordo com Oyane et al. (2003) com uma concentração de íons aproximadamente igual aos do plasma do sangue humano. A quantidade de volume de SBF foi determinada de acordo à norma ISO 10993-13 para a identificação e quantificação de produtos de degradação de dispositivos médicos confeccionados de materiais poliméricos. A concentração de lisozima de 1,5 µg/mL foi escolhida por ser semelhante à concentração encontrada no soro humano (Brouwer et al., 1984).

Adicionalmente, o pH das soluções foi aferido nos mesmos tempos experimentais que o ensaio de degradação através de um pHmetro. Assim como, microfotografias a 150X foram obtidas através de microscopia eletrônica com o intuito de observar a morfologia das matrizes ao final do ensaio de degradação.

4.2.4.2 *Ensaio de embebição*

As diferentes matrizes foram colocadas individualmente em microtubos de centrifugação de 5 ml contendo 2,144 ml de SBF (pH=7.4) a 37°C, durante 4 e 8 horas, tempo necessário para que as matrizes alcancem seu estado de equilíbrio. Após esse período, as matrizes foram retiradas, secadas cuidadosamente com papel filtro, transferidas para uma balança analítica eletrônica de precisão e pesadas (Pe). Posteriormente, foram liofilizadas e novamente pesadas (Pf). A porcentagem de água absorvida pelas matrizes em condições de equilíbrio (TEE%) foi calculada pela seguinte fórmula (Tseng et al, 2013):

$$TEE\% = \frac{Pe - Pf}{Pe} \times 100$$

O SBF foi preparado de acordo com Oyane et al. (2003) com uma concentração de íons aproximadamente igual aos do plasma do sangue humano. A quantidade de volume de SBF foi determinada de acordo à norma ISO 10993-13 para a identificação e quantificação de produtos de degradação de dispositivos médicos confeccionados de materiais poliméricos.

4.2.4.3 *Ensaio de liberação de proteínas totais*

Para esse ensaio foram empregadas matrizes previamente esterilizadas por radiação gama (60Co, 25 kGy) no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares da USP. Após, as matrizes foram imersas em 2,144 ml de PBS pH = 7.4 e incubados a 37 °C por 1, 2, 8, 16, 24 e 32 dias. Vinte µl do sobrenadante foi coletado a cada tempo

experimental e armazenados a -80°C até completar todos os tempos experimentais. Posteriormente, a quantidade de proteínas totais libertadas ao meio no decorrer do tempo pelas matrizes foi determinada pelo método de Lowry et al. (1961).

A quantidade de volume de PBS foi determinada de acordo à norma ISO 10993-13 para a identificação e quantificação de produtos de degradação de dispositivos médicos confeccionados de materiais poliméricos. Como controle negativo foi empregado PBS sem adição de nenhuma matriz.

4.2.5 Caracterização biológica *in vitro*

Nos seguintes ensaios, as matrizes foram padronizadas em discos cilíndricos de 4 mm de altura x 4 mm de diâmetro com o auxílio de uma broca trefina de diâmetro de 5 mm. Após, as matrizes foram esterilizadas por radiação gama (^{60}Co , 25 kGy) e armazenadas a -80°C .

Todos os ensaios correspondentes à caracterização biológica *in vitro* foram realizados no laboratório de pesquisa básica Edmir Matson do departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.2.5.1 Isolamento e caracterização celular

Os procedimentos de isolamento e caracterização de células-tronco da papila apical dentária humana utilizadas foram realizados de acordo com Sonoyama et al. (2008). Para tal, 3 terceiros molares inclusos extraídos com apicigênese incompleta foram utilizados. Os dentes foram coletados em meio mínimo essencial α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 100 μM ácido ascórbico, 2 mM L-glutamina e 100 U/ml penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina e mantidos à 4°C , por período máximo de 24 h. Em seguida, os dentes foram desinfetados com álcool 70%, e a papila apical removida com o auxílio de uma cureta, lavada duas vezes em solução

estéril de PBS A suplementado com 4% de antibiótico - penicilina e estreptomicina. Após remoção do PBS A, os fragmentos permaneceram em solução de tripsina em estufa a 37°C, durante 5 minutos. A tripsina foi inativada com meio de cultura enriquecido com soro fetal bovino e os explantes foram colocados em frascos de cultivo contendo meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 100 μ M de ácido ascórbico, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina por duas semanas. A migração celular dos explantes obtidos da papila dental humana iniciou-se aos 10 dias. Após, as células provenientes dos explantes foram tripsinizadas e plaqueadas em novas placas de cultivo. As culturas foram mantidas em semi-confluência. Atingindo 60% de confluências, as células foram ressuspensas em meio de cultura contendo 20% de SBF e 10% de DMSO e então armazenadas em freezer de nitrogênio líquido.

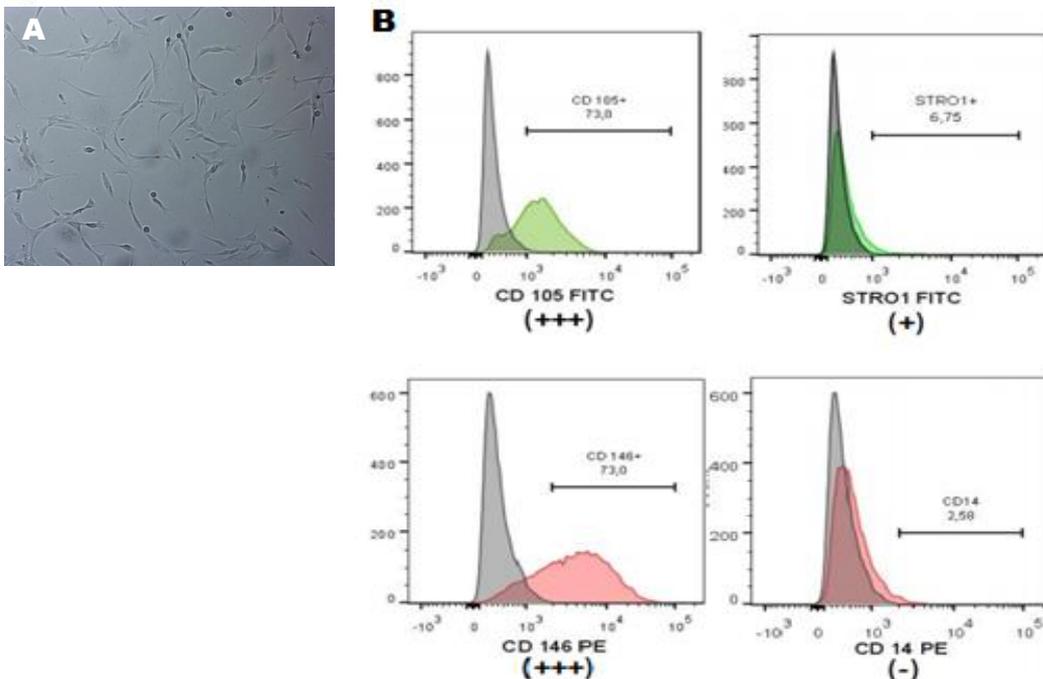
Para os experimentos, alíquotas congeladas em nitrogênio líquido e crioprotetidas por DMSO foram descongeladas em banho de água a 37°C por dois minutos. Após a remoção do meio contendo DMSO, as células foram cultivadas no meio de cultivo descrito acima nomeado de clonogênico. O monitoramento do crescimento celular foi realizado diariamente em microscópio de fase invertido, e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Quando as células atingiram subconfluência, foram tripsinizadas e plaqueadas novamente. Esse procedimento foi repetido até que as células se encontraram em passagem três.

A caracterização imunofenotípica do conjunto de células nessa passagem foi realizada através de citometria de fluxo. Para tal, as células numa concentração de 1×10^6 foram lavadas duas vezes em PBS e colhidas com solução de enzima marinha com atividade colagenolítica e proteolítica (StemProAccutase) por 10 min, sob agitação, para minimizar a internalização de antígenos de superfície. As células foram centrifugadas e fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) a 4% por 1 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes em PBS. Posteriormente, foi adicionada uma solução de albumina de soro bovino 5% por 1 h para bloqueio de sítios inespecíficos. Após, as células foram ressuspensas em PBS e marcadas com anticorpos primários e incubadas por 1 h. Finalmente, as células foram lavadas três vezes em PBS e as células suspensas no PBS foram filtradas, e colocada em tubos para o citometria de fluxo.

Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente a progênie das populações celulares de papila dental, foi utilizado um painel de anticorpos primários conjugados com fluoresceína, ficoeritrina ou alofococianina, contra moléculas de superfície celular humanas, a saber: CD105, STRO-1, CD146 e CD14. A população celular foi contada e classificada pelo departamento de imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Assim, observaram-se células isoladas expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. Os histogramas obtidos por citometria de fluxo mostraram expressão positiva para os seguintes marcadores: CD 105, CD 146 e STRO-1. As células apresentaram mínima expressão do marcador CD 14.

Figura 4.2 –Fotomicrografia das células isoladas da papila dental humana (A) e histogramas da expressão de marcadores de superfície pelas células (B). Os números dentro dos gráficos indicam a porcentagem de células positivas para o anticorpo primário para cada tipo de marcador de superfície (CD 105, STRO-1, CD 146, CD 14). Os picos cinzentos representam os controles isotípicos de cada marcador. Os picos representam a população celular marcada com os anticorpos conjugados aos fluoróforo FITC (picos verdes) ou PE (picos vermelhos)



Fonte: O autor

4.2.5.2 *Ensaio de citotoxicidade*

A citotoxicidade dos produtos da degradação das matrizes foi avaliada através do teste de extração de acordo com a norma ISO 10993-12:2012 e a norma ISO 10993-5:2019. Assim, as matrizes de 1,25 cm² foram imersas em 1 ml de meio clonogênico, e mantidas por 24 horas em incubadora a 37°C, sob atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

Paralelamente, células-tronco da papila dental da terceira passagem foram descongeladas e cultivadas em meio clonogênico, até que registrasse uma confluência celular de aproximadamente 80%. Durante esse período, o meio foi trocado a cada 48 horas. Uma vez obtida a confluência ideal, as células foram tripsinizadas, plaqueadas em uma densidade de 1×10^3 em placa de 96 poços, e incubadas por 24 horas. Após, o meio clonogênico das células foi trocado pelo meio condicionado com as matrizes, e as células foram incubadas por mais 24 horas. Finalizando esses períodos, o meio foi substituído por 170 µl de meio clonogênico não suplementado com soro bovino fetal acrescido de 30 µl de MTT e as células incubadas por 4 horas. Posteriormente, o meio foi removido, e colocado 50 µl de DMSO, deixado por 30 minutos em agitação. Após, 50 µl de DMSO foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro empregando o filtro de 562 nm.

Para este ensaio o meio foi condicionado por quatro matrizes elaboradas em tempos diferentes. Para cada tipo de matriz, foram plaqueados 8 poços.

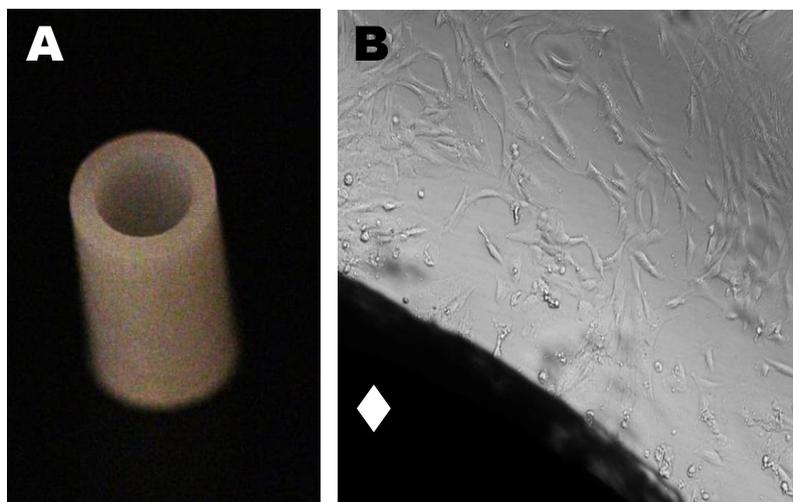
Adicionalmente, a citotoxicidade das matrizes foi avaliada através do teste de contato direto de acordo com a norma 10993-5:2019. Para este teste, as matrizes (n=2) previamente embebidas por 4 horas em meio clonogênico foram colocadas nos poços de placa de cultivo de 96 poços. Posteriormente, foram inoculadas com células-tronco da papila dental numa densidade de 1×10^3 . O meio de cultura das placas foi trocado a cada dois dias. Após 2 e 8 dias foram obtidas fotomicrografias da interface matriz-placa de cultura através de microscópio de fase invertido a um aumento de 20X. Como controle foram empregados poços inoculados com células sem a presença da matriz.

4.2.5.3 *Morfologia, adesão e proliferação celular nas matrizes*

Dez matrizes de cada tipo foram implantadas num tubo de politetrafluoretileno selado na parte inferior com membrana a base celulose (Millipore), e colocadas numa placa de 96 poços, sendo esterilizadas por radiação gama (^{60}Co , 25 kGy). Após, cada matriz foi inoculada com meio clonogênico contendo 5×10^4 células. Depois de ser incubado por 3 horas, o conjunto matriz/tubo foi removido e colocado em uma placa de 48 poços. Nessa placa, foram mantidas em incubação por 4 ou 8 dias a 37°C e 5% CO_2 . O meio foi trocado a cada dois dias, até completar os diferentes tempos experimentais.

A biocompatibilidade celular do tubo empregado neste ensaio foi previamente testada sobre células-tronco da papila dental através do ensaio de contato direto. As microfotografias obtidas mostraram íntimo contato das células com a estrutura tubular.

Figura 4.3 – Fotografia (A) do tubo de politetrafluoretileno e microfotografia (B) das células-tronco da papila dental cultivada em presença do tubo (♦).



Fonte: O autor

O emprego desses tubos teve como objetivo permitir a adequada fixação das matrizes e permitir sua manipulação indireta durante o experimento assim como a de simular a condição clínica do interior do canal radicular onde os nutrientes provem somente da região apical.

A viabilidade das células inoculadas de seis matrizes de cada grupo foi avaliada aos 4 e 8 dias pelo ensaio de MTT. Para tal, o conjunto matriz/tubo foi removido da placa de 48 poços e colocado numa nova placa. Previamente, os poços dessa nova placa foram preenchidos com 340 µl de meio clonogênico não suplementado com soro bovino fetal acrescido de 60 µl de MTT. Após quatro horas de incubação, o meio foi removido, e as matrizes foram cuidadosamente retiradas do interior de tubo. Posteriormente, as matrizes foram submersas em 200 µl de DMSO e deixados por 30 minutos em agitação. Após, 50 µl de DMSO foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada num espectrofotômetro empregando o filtro de 562 nm.

A morfologia e adesão das células nas matrizes após 4 e 8 dias foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura. Assim, terminado cada período de incubação, duas matrizes de cada grupo foram lavadas em solução tampão de cacodilato 0,05 M, fixadas em glutaraldeído 2% por 20 minutos, desidratadas gradualmente em etanol, e finalmente, o excesso de líquido removido pela imersão em hexametildisilazano HDMS por 5 minutos. As matrizes foram fixadas num suporte de alumínio com fita carbonada, revestidas com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura a 150X ou 200X. Aumentos superiores a 900X foram realizados com o intuito de observar as particularidades das células presentes.

Como grupo controle positivo, as células foram cultivadas sobre discos de poliestireno de 8 mm de diâmetro, o que corresponde a uma superfície de 52 mm² equivalente à superfície total das matrizes. A inoculação, cultivo e avaliação da viabilidade e adesão foram realizados de maneira semelhante com todas as matrizes. Tanto o grupo controle como nos grupos experimentais, os testes de viabilidade estiveram compostos por 8 amostras, e por 2 amostras para a avaliação da adesão e morfologia celular.

4.2.5.4 *Diferenciação celular*

Visando avaliar a capacidade de odonto/osteo diferenciação das hSCAPs no interior das matrizes, as células foram inoculadas nas matrizes como foi previamente descrito no item 4.2.5.3, e após 7 dias, o meio de cultivo clonogênico foi substituído pelo meio odonto/osteogênico contendo α -MEM, 15% de soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina e 100 μ g/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 100 μ M ácido ascórbico, 1,8 mM fosfato de potássio e 10 μ M dexametasona por 21 dias a 37°C e 5%CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias. Após o término do tempo experimental, a indução de formação de nódulos mineralizados pelas células nas matrizes foi evidenciada através da coloração com vermelho de Alizarina. Assim, as matrizes foram cuidadosamente removidas do tubo de Ptfе transferidas para uma nova placa de 24 poços, lavadas duas vezes em PBS, fixadas com isopropanol a 60%, desidratadas em água destilada, e coradas com solução de vermelho de alizarina a 1% (pH 4,2) por 4 horas. Após, foram lavadas exaustivamente com PBS e deixado secar no ambiente. Posteriormente, foi adicionada uma solução de 10 % de amônia, e deixados por 30 minutos em agitação. Alíquotas de 50 μ l foram transferidas para uma placa de 96 poços e a densidade óptica do sobrenadante foi medida num espectrofotômetro empregando o filtro de 490 nm.

Como grupo controle positivo, as células foram cultivadas sobre discos de poliestireno de área superficial compatível com o das matrizes. A inoculação, o cultivo e a avaliação da diferenciação foram realizados de maneira semelhante com todas as matrizes. Como controle negativo foram empregadas matrizes sem inoculação de células-tronco e células cultivadas com meio clonogênico sobre os discos.

Tanto o grupo controle e os grupos experimentais no teste de diferenciação celular esteve composto por 8 amostras.

4.2.6 Caracterização antimicrobiana *in vitro*

Todas as etapas do preparo referentes à caracterização microbiológica das matrizes foram realizadas no laboratório da Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

O efeito das matrizes sobre o crescimento bacteriano em suspensão foi avaliado através do método de cultura bacteriana. Para tal, *E. faecalis* (ATCC 29212) foi cultivado em BHI por 24 horas. Após, a suspensão bacteriana foi diluída em BHI para obter uma concentração aproximada de 1×10^5 UFC/ml. Ao início do experimento, quatro alíquotas de 100 μ l da suspensão foram coletadas, diluídas seriadas por 10 vezes em soro fisiológico e cultivadas em m-Enterococcus ágar por 48 horas. Assim, a média das UFC/ml obtidas foi considerada como o número inicial de bactérias na suspensão. Após a coleta das alíquotas, os diferentes tipos de matrizes desenvolvidos foram inoculados com 200 μ l da suspensão bacteriana e cultivados por 48 horas a 37°C numa placa de 96 poços. Uma alíquota de 10 μ l foi coletada de cada poço em 6, 24 e 48 horas previamente à ressuspensão do meio de cultura. A amostra coletada foi diluída seriadamente por 10 vezes em soro fisiológico, e plaqueada em triplicada em m-Enterococcus ágar. Após 48 horas, foi realizada a contagem das UFC/ml. Como grupo controle positivo, 200 μ l da suspensão bacteriana foi transferida em poços sem a presença de nenhuma matriz, e assim, cultivado, coletado, diluído e plaqueado, como nos grupos experimentais. Tanto o grupo controle como os grupos experimentais foram compostos por 8 amostras cada.

O efeito da composição das matrizes sobre a adesão bacteriana na sua superfície foi observado através de eletromicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Para tal, *E. faecalis* (ATCC 29212) foi cultivado em BHI por 24 horas. Após, a suspensão bacteriana foi diluída em BHI para obter a concentração aproximada de 1×10^5 UFC/ml. As diferentes tipos de matrizes desenvolvidas foram inoculados com 200 μ l da suspensão bacteriana e cultivados por 48 horas a 37°C em placa de 96 poços. Após, as matrizes foram cuidadosamente lavadas com solução tampão de cacodilato 0,05 M para eliminar bactérias não aderidas à superfície. Posteriormente, estas matrizes foram fixadas em glutaraldeído 2% por 20 minutos, desidratadas gradualmente em etanol, e finalmente, o excesso de líquido removido

pela imersão em hexametildisilazano HDMS por 5 minutos. As matrizes foram fixadas em suporte de alumínio com fita carbonada, revestidas com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro, e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura a 900X. Aumentos superiores a 3500X foram realizados com o intuito de observar as particularidades das bactérias presentes nas matrizes. As eletromicrografias foram obtidas da superfície externa da matriz. Como grupo controle positivo, 200 µl da suspensão bacteriana foi transferida em poços contendo filtro de papel, cultivadas e processadas, nas mesmas condições que os grupos experimentais.

O efeito das componentes liberados pelas matrizes sobre o crescimento bacteriano em suspensão foi avaliado através do método de cultura bacteriana. Para tal, *E. faecalis* (ATCC 29212) foi cultivado em BHI por 24 horas. Após, a suspensão bacteriana foi diluída em BHI para obter concentração aproximada de 1×10^5 UFC/ml. Ao início do experimento, quatro alíquotas de 100 µl da suspensão foram coletadas, diluídas em série por 10 vezes em soro fisiológico, e cultivadas em m-Enterococcus ágar por 48 horas. Assim, a média das UFC obtida foi considerada como o número inicial de bactérias na suspensão. Após a coleta das alíquotas, 100 µl de soro fisiológico esterilizado condicionado pelas matrizes por 8 dias a 37°C foi adicionada a 100 µl da suspensão bacteriana. Após 6, 24 e 48 horas, uma alíquota de 10 µl foi coletada previamente à ressuspensão do meio de cultura. A amostra coletada foi diluída seriadamente por 10 vezes em soro fisiológico e plaqueada em triplicada em m-Enterococcus ágar. Após 48 horas foi realizada a contagem das UFC/ml. Como grupo controle positivo 100 µl de soro fisiológico esterilizado não condicionado foi acrescido a 100 µl da suspensão bacteriana e cultivado, coletado, diluído e plaqueado como nos grupos experimentais. Tanto o grupo controle como os grupos experimentais foi composto por 8 amostras cada.

4.2.7 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística com o auxílio do software R 3.5.0. A análise de aderência à curva de normalidade foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade dos dados foi avaliada pelo teste de Levene.

Assim, a análise do tamanho dos poros das matrizes desenvolvidas foi avaliada pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

As análises intragrupo e entre grupos da degradação e da embebição das matrizes foram avaliadas pelo teste de teste de ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

A análise intragrupo da liberação de proteínas pelas matrizes nos diferentes tempos experimentais foi avaliada pelo teste de ANOVA medidas repetidas, seguido pelo teste de comparações múltiplas T pareado ajustado pelo método de Bonferroni. Para a análise entre grupos, foram incluídas somente as matrizes que não degradaram até o final do tempo experimental, e esses dados foram avaliados pelo teste de ANOVA para dados independentes, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ambos com correção para dados com heterocedasticidade.

A análise intragrupo da viabilidade celular em presença do meio condicionado pelas matrizes foi avaliada pelo teste T para dados independentes. A análise entre grupos da porcentagem de viabilidade celular foi avaliada pelo teste de ANOVA para dados independentes, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os mesmos testes foram empregados para a análise entre grupos dos valores de densidade óptica obtidos no ensaio, porém com correção para dados com heterocedasticidade.

A análise intragrupo da viabilidade celular nas matrizes foi avaliada pelo teste T para dados independentes, e a análise entre grupos foi avaliada pelo teste de ANOVA para dados independentes, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ambos com correção para dados com heterocedasticidade.

A análise entre grupos da diferenciação celular nas matrizes através do ensaio de vermelho de alizarina foi avaliada pelo teste de ANOVA para dados independentes, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

A análise intragrupo dos dados obtidos na caracterização antimicrobiana foi avaliada pelo teste de Friedman seguido do teste de comparações múltiplas de Nemenyi com correção para dados pareados. A análise entre grupos foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

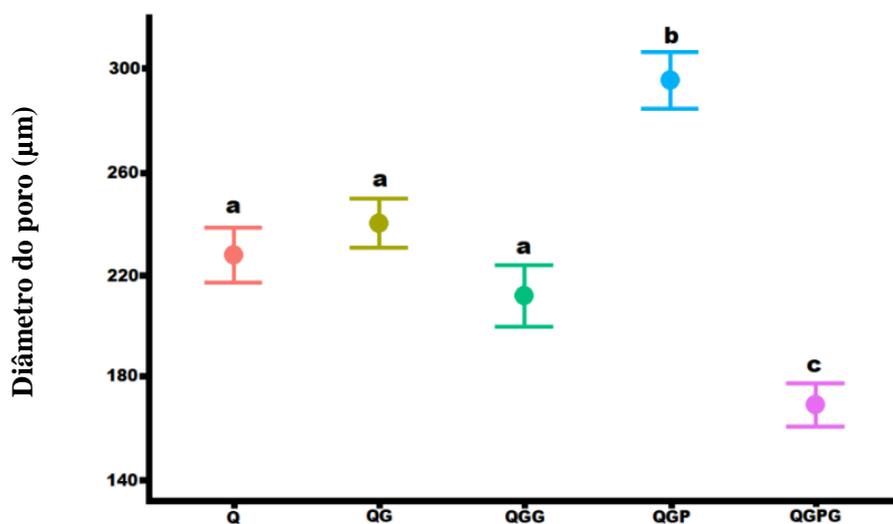
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica das matrizes solidas

Microscopicamente, todas as matrizes elaboradas apresentaram poros com interconectividade. No entanto, a dentina em pó quando adicionada à matriz foi incorporada e distribuída de forma homogênea na estrutura, tornando a superfície rugosa (Figura 5.2).

A matriz não reticulada composta de quitosana, gelatina e dentina apresentou poros com tamanho médio de 295 μm , sendo maior que os poros das demais matrizes analisadas ($p < 0.05$). No entanto, quando a mesma foi reticulada com genipina apresentou poros com tamanho médio de 161 μm , sendo menor que os poros das outras matrizes ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa entre o tamanho dos poros das matrizes compostas de quitosana pura e quitosana com gelatina reticulada ou não com genipina ($p > 0.05$), possuindo poros com tamanho médio de 227, 211 e 240 μm , respectivamente (Figura 5.1).

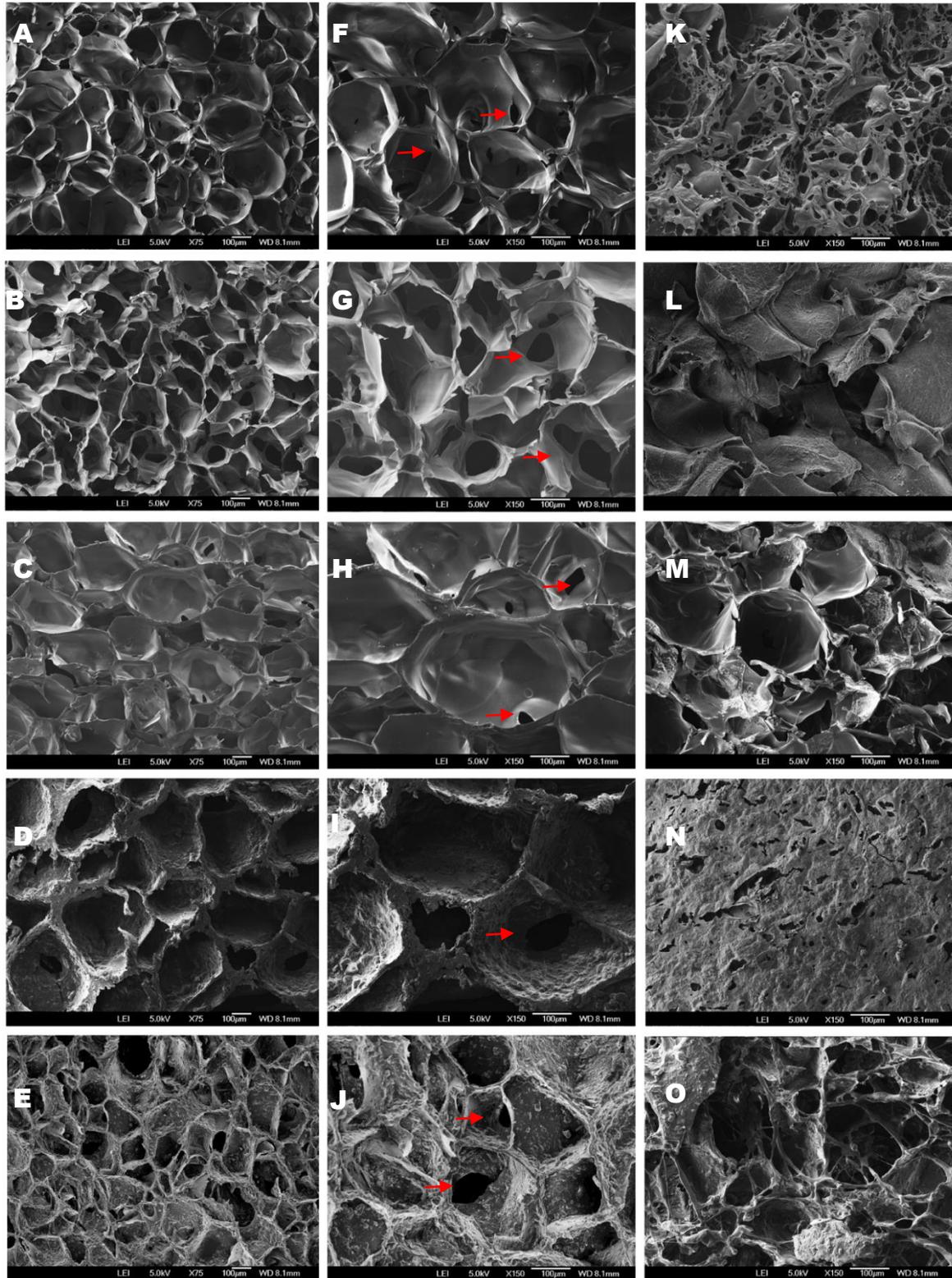
Figura 5.1 – Tamanho médio dos poros das matrizes solidas



Q – Quitosana; QG- Quitosana e gelatina; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGP – Quitosana, gelatina e pó de dentina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina.
^{a-c} Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos ($p < 0.001$).

Fonte: O autor

Figura 5.2 – Características morfológicas das matrizes antes (A - J) e depois do ensaio de degradação (K-O). Matrizes de quitosana pura (A,F,K). Matrizes de quitosana e gelatina (B,G,L). Matrizes reticuladas de quitosana e gelatina (C,H,M). Matrizes de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó (D,I,N). Matrizes reticuladas de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó (E,J,O). Setas vermelhas indicam interconectividade dos poros



5.2 Caracterização físico-química

5.2.1 Ensaio de degradação

Nas microfotografias obtidas ao final do ensaio de degradação, pôde-se observar que a estrutura das matrizes não reticuladas de quitosana e gelatina com ou sem adição de dentina em pó perderam suas características morfológicas iniciais (Figuras 5.2g-l e 5.2i-n). Contrariamente, a estrutura da matriz reticulada de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó e de quitosana pura apresentam-se mais porosas (Figuras 5.2j-o e 5.2f-k). No caso das matrizes reticuladas de quitosana e gelatina não houve mudança quando comparada com as microfotografias iniciais (Figuras 5.2h-m).

No que se refere à medição do pH, os resultados demonstram que não houve variação em todos os tempos experimentais, com valor médio constante de 7,4.

De todas as matrizes avaliadas, somente as não reticuladas compostas de quitosana com gelatina acrescidas ou não de dentina em pó teve a estrutura completamente degradada, ocorrendo no tempo experimental de 2 e 8 dias, respectivamente. Com exceção da matriz não reticulada de quitosana com gelatina e dentina em pó, todas as outras matrizes tiveram a degradação aumentada a partir do 8º dia ($p < 0.05$). A taxa de degradação das matrizes reticulada ou não composta de quitosana e gelatina acrescida ou não de dentina em pó foi semelhante entre si ($p > 0.05$), porém menor quando comparadas às demais matrizes nos tempos de 2, 8, 16 e 32 horas ($p < 0.05$). No entanto, no tempo experimental de 24 horas, a matriz reticulada de quitosana e gelatina foi semelhante à quitosana pura ($p > 0.05$), no qual foram maiores que a matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina ($p < 0.05$), e menor que as não reticuladas compostas de quitosana com gelatina acrescidas ou não de dentina em pó ($p < 0.05$). O percentual de degradação das diferentes matrizes estudadas nos diferentes tempos experimentais, bem como a comparação intra e entre grupos podem ser observadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Porcentagem média (desvio padrão) de degradação da estrutura das matrizes analisadas em diferentes tempos experimentais

Grupo	Tempos experimentais (dias)				
	2	8	16	24	32
Q	19.7(1.71) [£]	28.5(2.89) [¥]	34.5(3.7) [†]	39.0(3.16) ^{a, ¥, †}	56.7(6.24) [€]
QG	75.7(18.92) [£]	100 [¥]	100 [¥]	100 [¥]	100 [¥]
QGG	8.2(1.71) ^{a, £}	18.0(2.16) ^{a, ¥}	27.7(2.63) ^{a, †}	39.2(2.22) ^{a, €}	41.2(2.99) ^{a, €}
QGP	100 [¥]	100 [¥]	100 [¥]	100 [¥]	100 [¥]
QGPG	7.5(2.08) ^{a, £}	18.5(1.29) ^{a, †}	28.5(3.11) ^{a, ¥}	32.7(2.22) [¥]	41.2(2.22) ^{a, €}

Q – Quitosana; QG- Quitosana e gelatina; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGP – Quitosana, gelatina e pó de dentina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina.
^a Letras iguais representam semelhança entre linhas ($p < 0.05$). Símbolos diferentes representam diferença significativa entre colunas ($p < 0.05$).

Fonte: O autor

5.2.2 Ensaio de embebição

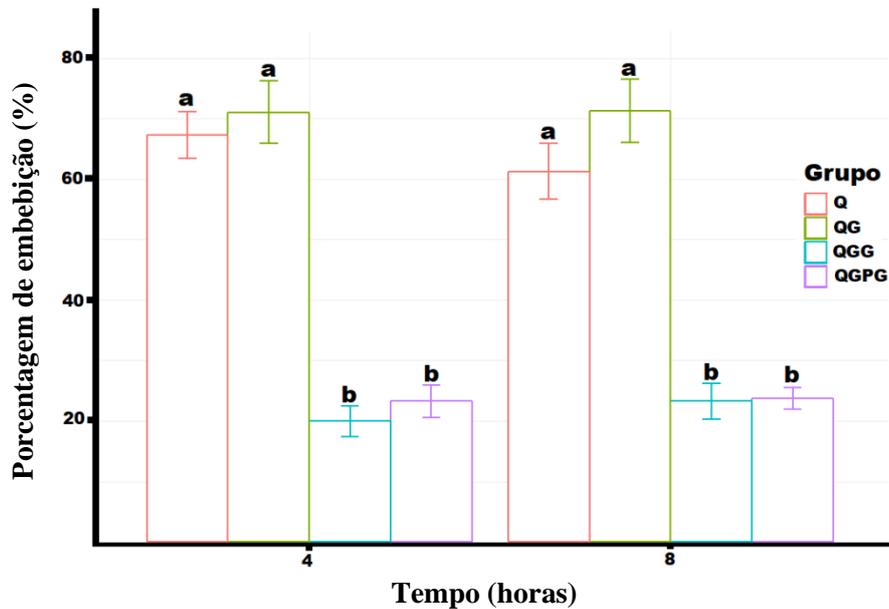
A estrutura da matriz não reticulada composta de quitosana, gelatina e dentina em pó degradou-se em 4 horas, sendo inviável a avaliação de embebição dessa matriz.

O maior percentual de embebição aconteceu na matriz não reticulada de quitosana e gelatina com valor médio de 71%, e o menor percentual ocorreu no mesmo tipo de matriz, porém quando reticulada, com valor médio de 20%, ambos no tempo de 4 horas.

As matrizes não reticuladas de quitosana pura e de quitosana e gelatina apresentaram maior percentual de embebição quando comparado com as matrizes reticuladas de quitosana e gelatina com adição ou não de dentina em pó tanto no tempo experimental de 4 horas como no de 8 horas ($p < 0.05$), sem diferença significativa entre os tempos ($p > 0.05$).

O percentual médio de embebição de todas as matrizes e a comparação entre elas no tempo de 4 e 8 horas podem ser observadas na figura 5.3.

Figura 5.3 – Porcentagem média de embebição da estrutura das matrizes avaliadas após 4 e 8 horas



Q – Quitosana; QG- Quitosana e gelatina; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. ^{a-c} Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0.05$).

Fonte: O autor

5.2.3 Ensaio de liberação de proteínas totais

Todas as matrizes liberaram proteínas, porém com pico máximo de liberação em diferentes tempos de acordo com a composição da matriz. A matriz composta de quitosana pura atingiu a quantidade máxima de liberação de no 2º dia com média de 10,1 $\mu\text{g/ml}$, porém sem diferença significativa com o 1º e o 8º dia. A matriz não reticulada composta de quitosana e gelatina atingiu sua quantidade máxima de liberação com média de 2338,3 $\mu\text{g/ml}$ no 8º dia, porém sem diferença significativa com o 2º e 16º dia ($p > 0.05$). A matriz reticulada composta de quitosana e gelatina atingiu sua quantidade máxima de liberação com média de 1450,7 $\mu\text{g/ml}$ ao 24º dia, sendo significativamente maior que o 32º dia ($p < 0.05$), porém sem diferença significativa com o 16º dia ($p > 0.05$). A matriz não reticulada composta de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó atingiu sua quantidade máxima de liberação com média de 2213 $\mu\text{g/ml}$ ao 32º dia, porém sem diferença significativa com o 24º dia ($p > 0.05$). A matriz reticulada composta de quitosana, gelatina e dentina em pó atingiu sua

quantidade máxima de liberação com média de 1939,6 µg/ml no 16º dia, sem diferença significativa com o 8º ($p>0.05$), porém significativamente maior que o 24º ($p<0.05$). No controle não foi detectado a presença de proteínas em nenhum tempo experimental. A quantidade média de proteínas totais liberadas ao meio pelas diferentes matrizes no decorrer dos tempos experimentais podem ser observadas na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Quantidade média (desvio padrão) de proteínas totais (µg/ml) liberadas ao meio pelas diferentes matrizes no decorrer dos tempos experimentais

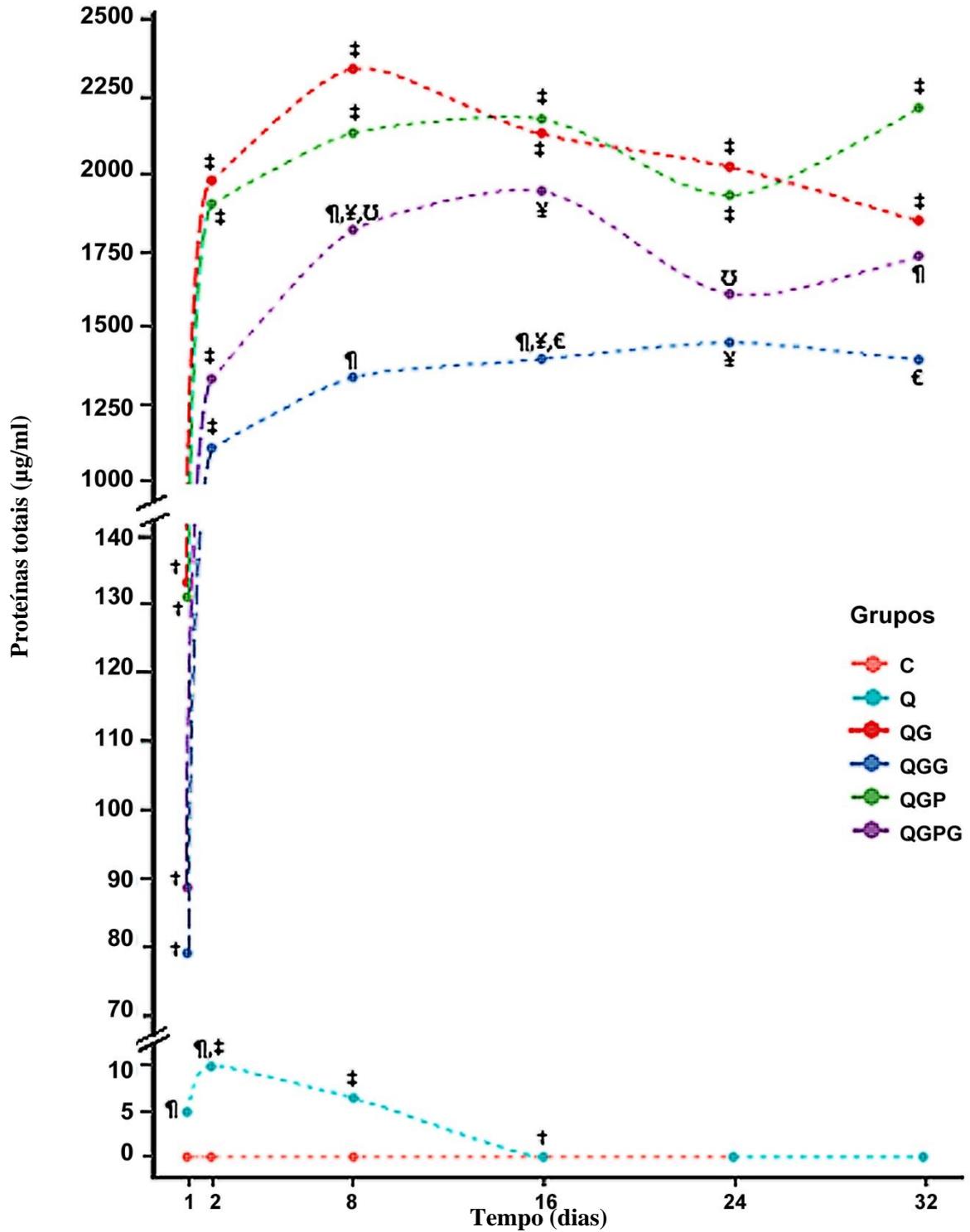
Grupo	Tempos experimentais (dias)					
	1	2	8	16	24	32
Q	4.8(1.06)	10.1(2.19)	7.4(2.08)	0.0	0.0	0.0
QG	132.9(7.92)	1975.8(107.21)	2338.3(286.06)	2130.4(313.43)	2020.6(320.62)	1846.0(339.94)
QGG	78.9(0.56)	1108.9(11.34)	1337.8(21.83)	1396.8(19.37)	1450.7(12.34)	1393.8(21.41)
QGP	130.6(4.49)	1901.0(42.52)	2132.0(6.60)	2114.1(163.18)	1928.1(133.96)	2213.0(66.65)
QGPG	88.1(2.04)	1333.9(41.91)	1816.2(94.51)	1939.6(39.13)	1609.5(17.02)	1730.8(15.54)

Q – Quitosana; QG- Quitosana e gelatina; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGP – Quitosana, gelatina e pó de dentina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina.

^a Símbolos diferentes representam diferença significativa entre colunas ($p<0.05$).

Fonte: O autor

Figura 5.4 – Curva de liberação de proteínas totais das matrizes avaliadas ao decorrer dos tempos experimentais. PBS sem matrizes (C). Media. Símbolos diferentes representam diferença estatisticamente significativa intragrupo ($p < 0.05$)

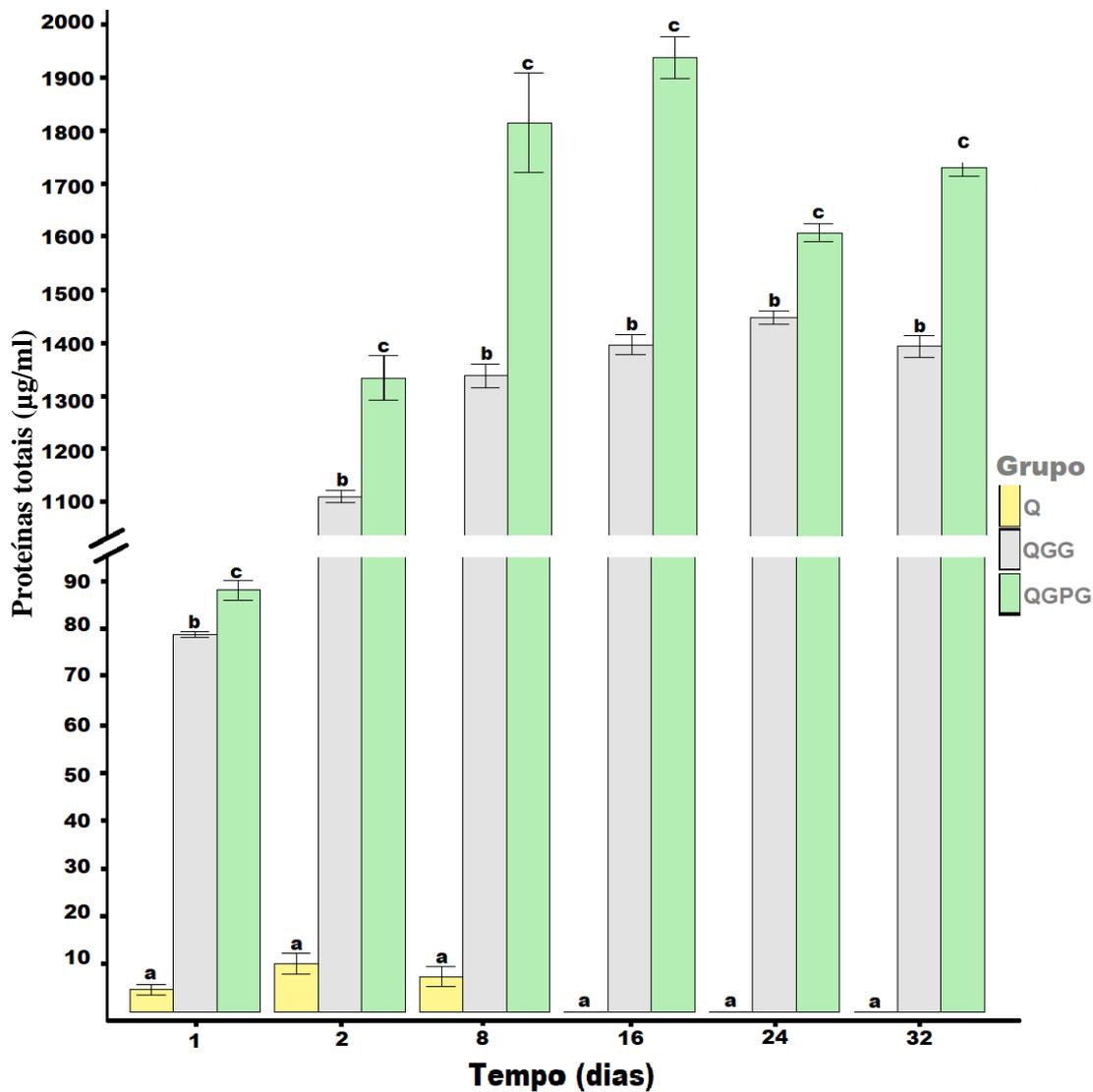


C – PBS sem matriz (Controle); Q – Quitossana; QG- Quitossana e gelatina; QGG – Quitossana e gelatina reticulada com genipina; QGPG - Quitossana, gelatina e dentina reticulada com genipina. Símbolos diferentes representam diferença significativa intragrupo ($p < 0.05$).

Fonte: O autor

A análise estatística entre grupos foi conduzida somente entre as matrizes que não degradaram até o tempo experimental final. Assim, em todos os tempos experimentais a quantidade de proteínas liberadas ao meio pela matriz reticulada composta de quitosana, gelatina e dentina em pó foi superior à matriz não reticulada de quitosana e gelatina e de quitosana pura ($p < 0.05$). A comparação entre grupos pode ser observada na figura 5.5

Figura 5.5 – Quantidade média de proteínas totais liberadas ao meio pelas das matrizes avaliadas no decorrer dos tempos experimentais



Q – Quitosana; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. ^{a-c}Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos ($p < 0.05$).

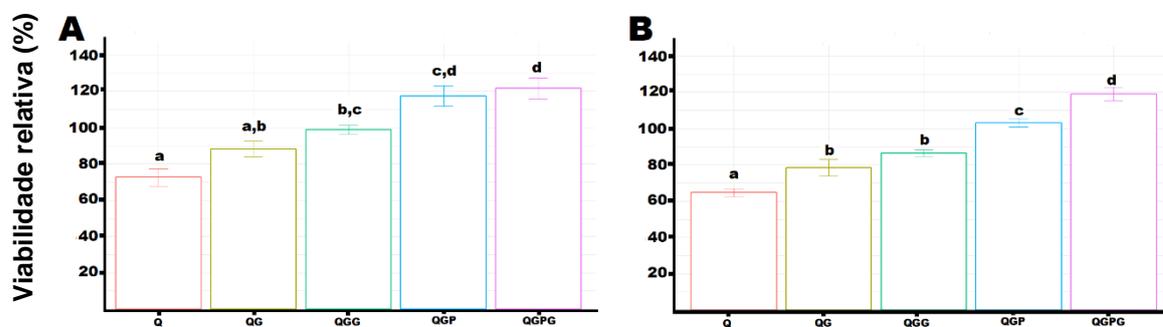
Fonte: O autor

5.3 Caracterização biológica *in vitro*

5.3.1 Ensaio de citotoxicidade

No que se refere à percentagem de células viáveis, nenhum dos meios condicionados pelas matrizes desenvolvidas reduziu a viabilidade celular a níveis inferiores a 60% em 24 e 48 horas de cultivo. A percentagem de viabilidade em 24 horas foi semelhante nas células cultivadas em médio condicionado com as matrizes reticulada ou não compostas de quitosana, gelatina e pó de dentina ($p>0.05$), porém somente quando reticulada, a viabilidade foi superior às células cultivadas em meio condicionado a todas as demais matrizes ($p<0.05$). Células expostas à quitosana pura apresentou o menor percentual de viabilidade ($p<0.05$), sendo semelhante somente quando esta matriz foi associada à gelatina ($p>0.05$). No tempo experimental de 48 horas, a maior e menor viabilidade continuou sendo referente às células cultivadas aos meios condicionados com matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó e com quitosana pura ($p<0.05$), respectivamente, porém nenhuma das matrizes apresentaram similaridade entre si neste tempo experimental ($p<0.05$). A percentagem de células-tronco viáveis após 24 e 48 horas de contato com meio condicionado pelas matrizes estudadas pode observada na figura 5.6.

Figura 5.6 - Percentagem (%) de células-tronco da papila apical dentária viáveis após 24 (A) e 48 (B) horas em meio de cultura celular condicionado com diferentes matrizes.

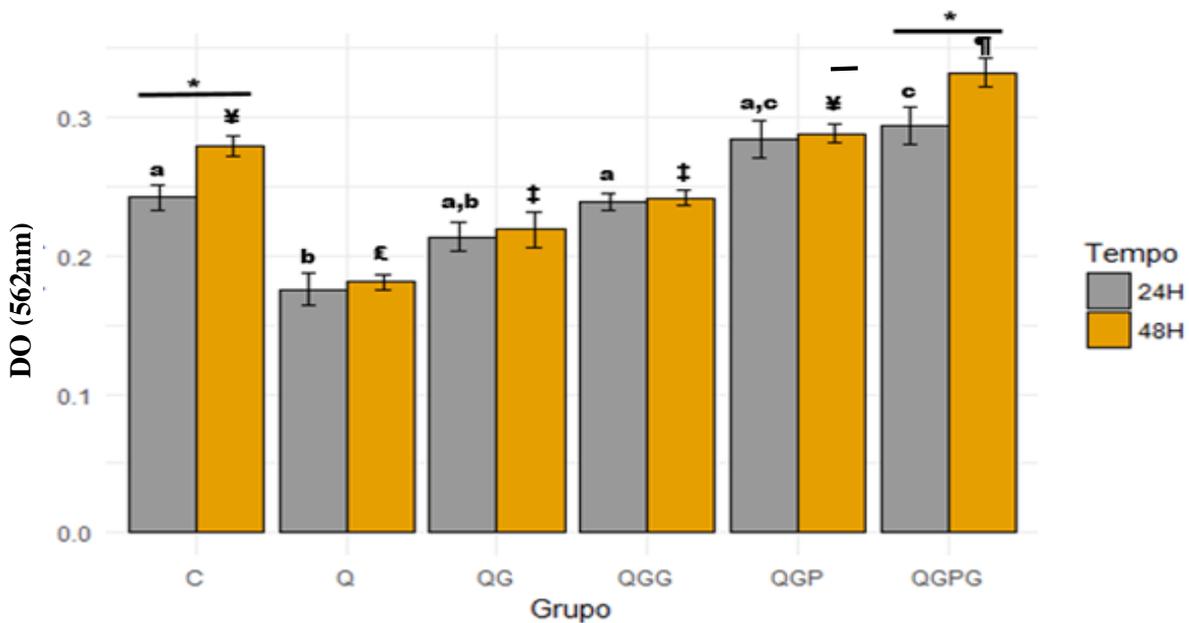


Q – Quitosana; QG- Quitosana e gelatina; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGP - Quitosana, gelatina e dentina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. ^{a-d} Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos ($p<0.05$).

Fonte: O autor

A comparação intragrupo através da absorvância do meio condicionado após cultura celular demonstrou que somente o meio condicionado pela matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó e o grupo controle apresentaram aumento de densidade óptica entre 24 e 48 horas ($p < 0.05$), sendo que todos os demais grupos apresentaram similaridade entre os dois tempos experimentais ($p > 0.05$). A comparação entre grupos apresentou que a matriz de quitosana pura obteve a menor densidade óptica entre os grupos, sendo semelhante somente ao meio condicionado por quitosana com gelatina no tempo de 24 horas de cultivo ($p > 0.05$), e diferente de todos os grupos no tempo de 48 horas ($p < 0.05$). Já a maior densidade óptica foi alcançada pelo meio condicionado pela matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó, sendo semelhante à sua versão não reticulada no tempo de 24 horas ($p > 0.05$), e diferente de todas as matrizes em 48 horas ($p < 0.05$). A comparação intra e entre grupos da absorvância do meio condicionado pelas matrizes estudadas nos tempos de 24 e 28 horas pode ser observada na figura 5.7.

Figura 5.7 – Densidade óptica por meio da absorvância do meio de cultura celular condicionado com as diferentes matrizes sobre células-tronco da papila apical dentária humana



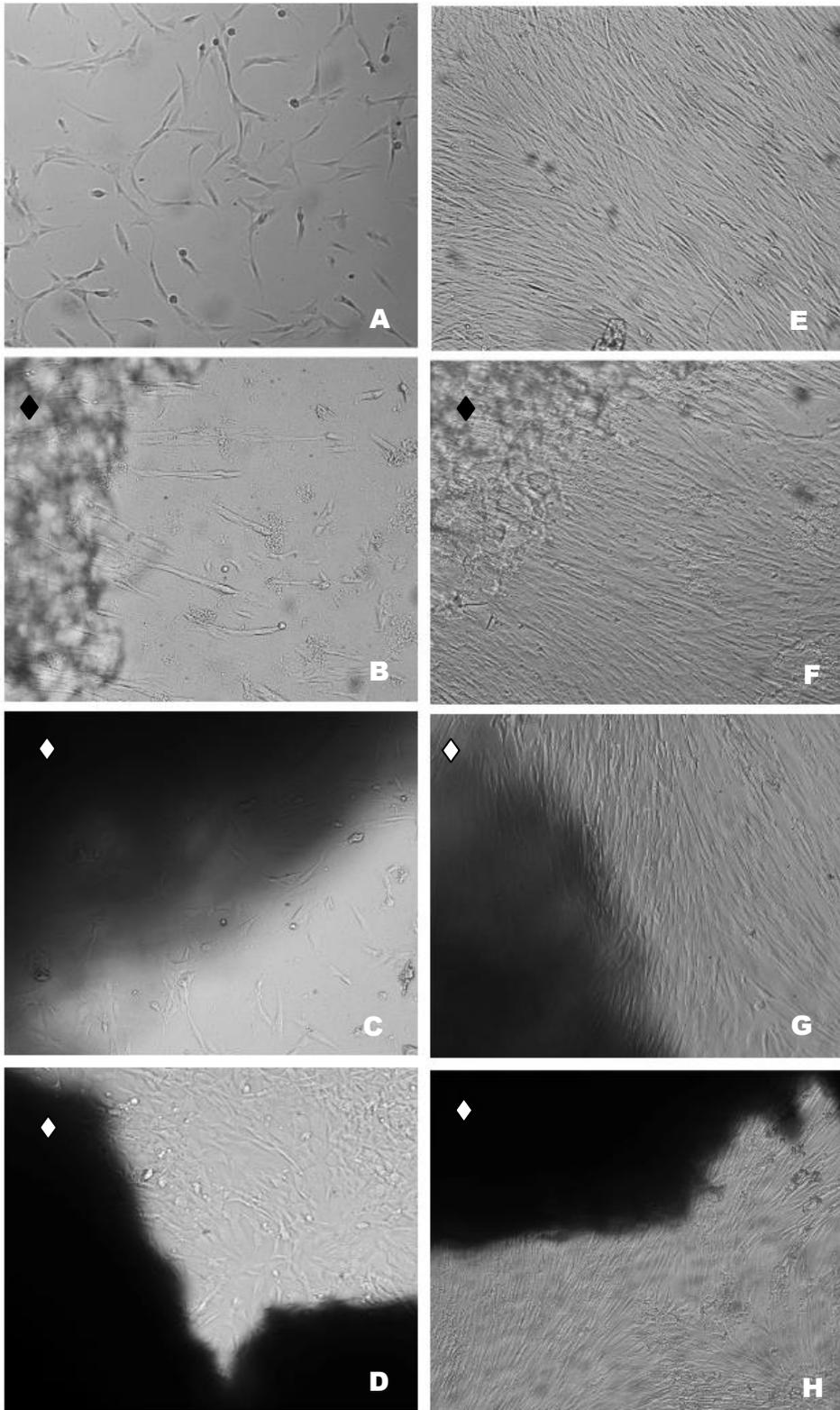
C – Meio não condicionado (Controle); q - Quitosana; QG- Quitosana e gelatina; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGP - Quitosana, gelatina e dentina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. (*) representa diferença intragrupo ($p < 0.05$). Letras e símbolos diferentes representam diferença significativa entre grupos no tempo de 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente ($p < 0.05$).

Fonte: O autor

Nos seguintes testes não foram empregadas as matrizes não reticuladas compostas por quitosona e gelatina com ou sem adição de dentina em pó devido à alta taxa de degradação estrutural que apresentaram impossibilitando a adequada realização dos testes.

No que se refere ao teste de contato direto, as fotomicrografias obtidas mostram íntimo contato das células com as matrizes assim como um comportamento celular semelhante ao controle (Figura 5.8).

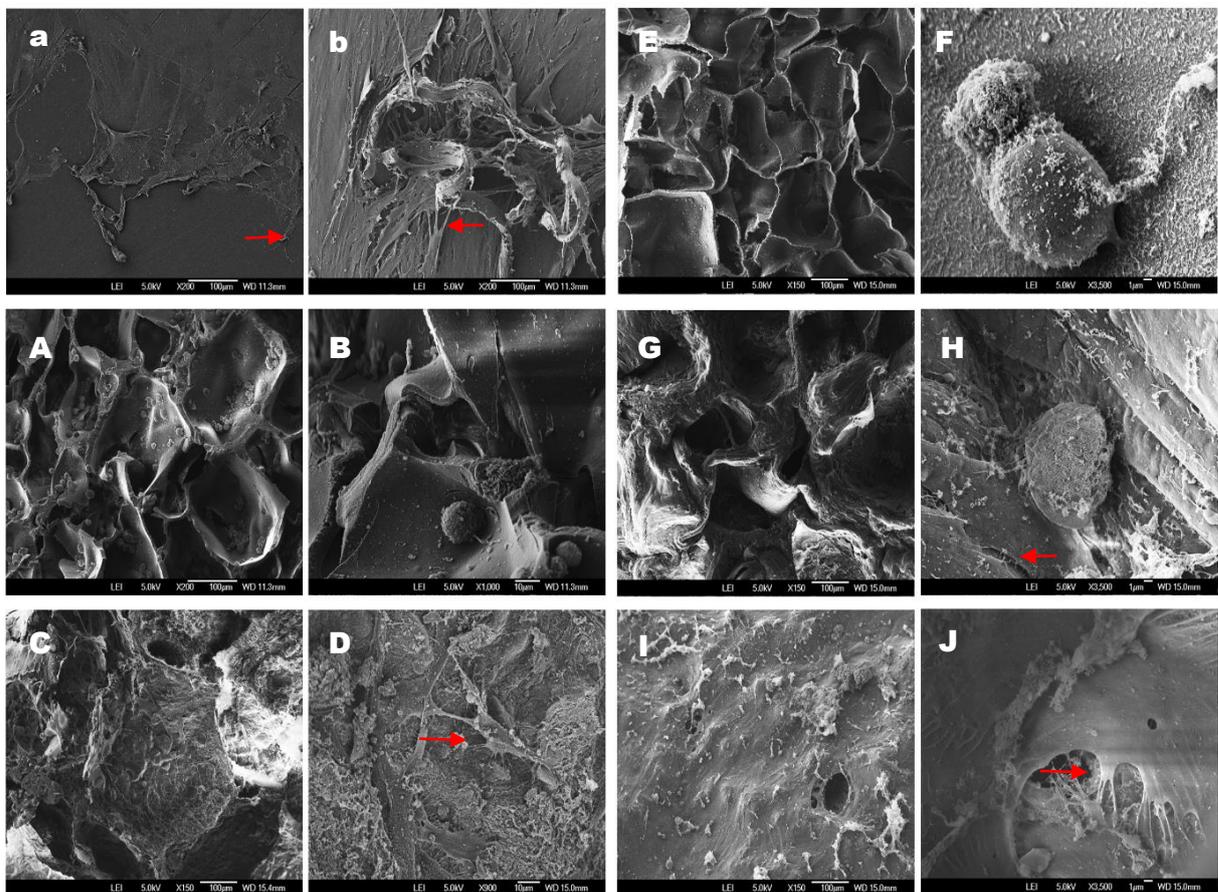
Figura 5.8 – Fotomicrografias das matrizes (♦) em contato direto com as células-tronco da papila dental humana aos 2 (B-D) e 8 (F-H) dias. Matrizes a base de quitosana pura (B,F). Matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina (C,G). Matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó (D,H). Células sem presença das matrizes aos 2 (A) e 8 (E) dias. Aumento 20X



5.3.2 Morfologia, adesão e proliferação celular nas matrizes

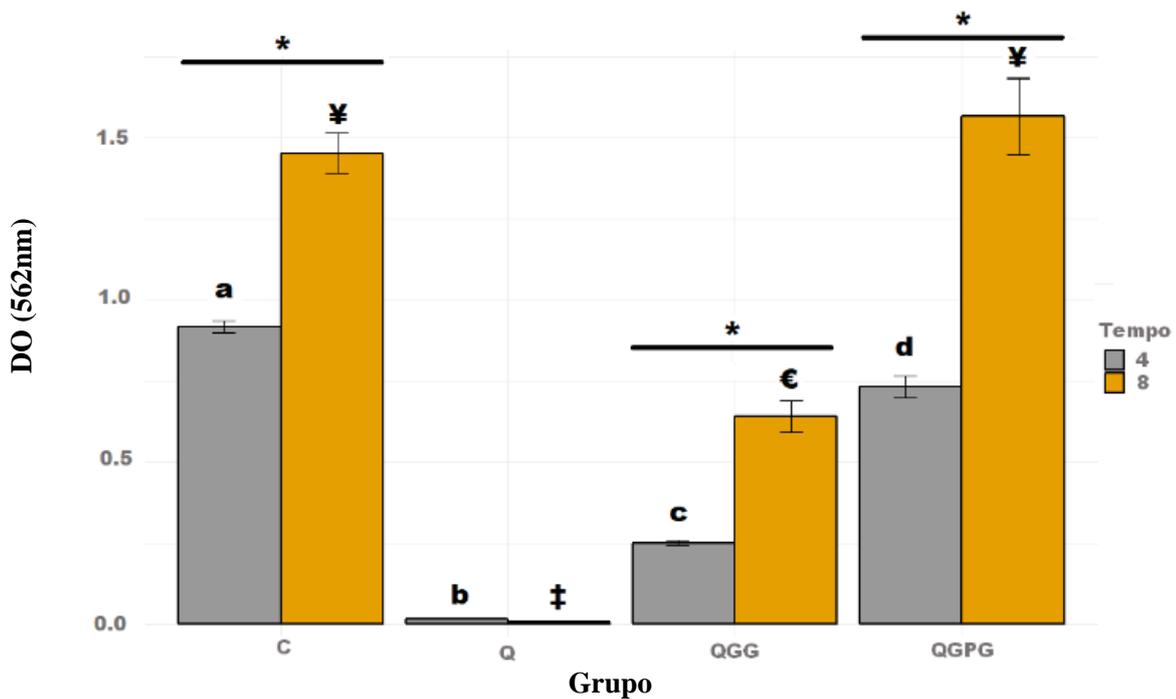
As eletromicrografias da superfície das matrizes de quitosana pura mostraram a presença células-tronco em forma de esferoides no 4° dia. Na matriz reticulada composta por quitosana e gelatina observou-se células com forma de esferoides ao 4° dia, porém, houve presença de algumas células espalhadas no 8° dia. Já na matriz reticulada composta por quitosana e gelatina com adição de dentina em pó, as células apresentaram morfologia semelhante às do controle no 4° dia, observando-se células espalhadas com presença de prolongações do seu citoesqueleto (filipódeas) aderidos na superfície, onde no 8° dia, a superfície da matriz apresentava-se completamente coberta pelas células-tronco (figura 5.9).

Figura 5.9 – Eletromicrografias das células-tronco da papila humana nas matrizes aos 4 (A-D) e 8 (E-J) dias. Matrizes a base de quitosana pura (E,F). Matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina (A,B,H,G). Matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó (C,D,I,J). Células cultivadas em discos de poliestireno aos 4 (a) e 8 (b) dias. Setas indicam filipódeas



Os grupos das matrizes reticuladas de quitosana e gelatina com ou sem adição de dentina em pó e o grupo controle apresentaram maior da viabilidade celular aos 8 dias em relação ao 4º dia ($p < 0.05$), sendo que a quitosana pura se manteve semelhante entre 4 e 8 dias ($p > 0.05$). Todos os grupos diferiram entre si quando avaliados no 4º dia ($p < 0.05$), sendo que a quitosana pura e o grupo controle obtiveram o menor e o maior valor de absorbância, respectivamente. No entanto, ao 8º dia, a matriz reticulada de quitosana e gelatina e o grupo controle foram semelhantes entre si ($p > 0.05$), apresentando os maiores valores de absorbância quando comparado aos demais grupos ($p < 0.05$). A quitosana pura manteve o menor quando avaliada no 8º dia ($p < 0.05$) (Figura 5.10).

Figura 5.10 – Densidade óptica da viabilidade celular nos diferentes tipos de matrizes solidas avaliadas no tempo de 4 e 8 dias

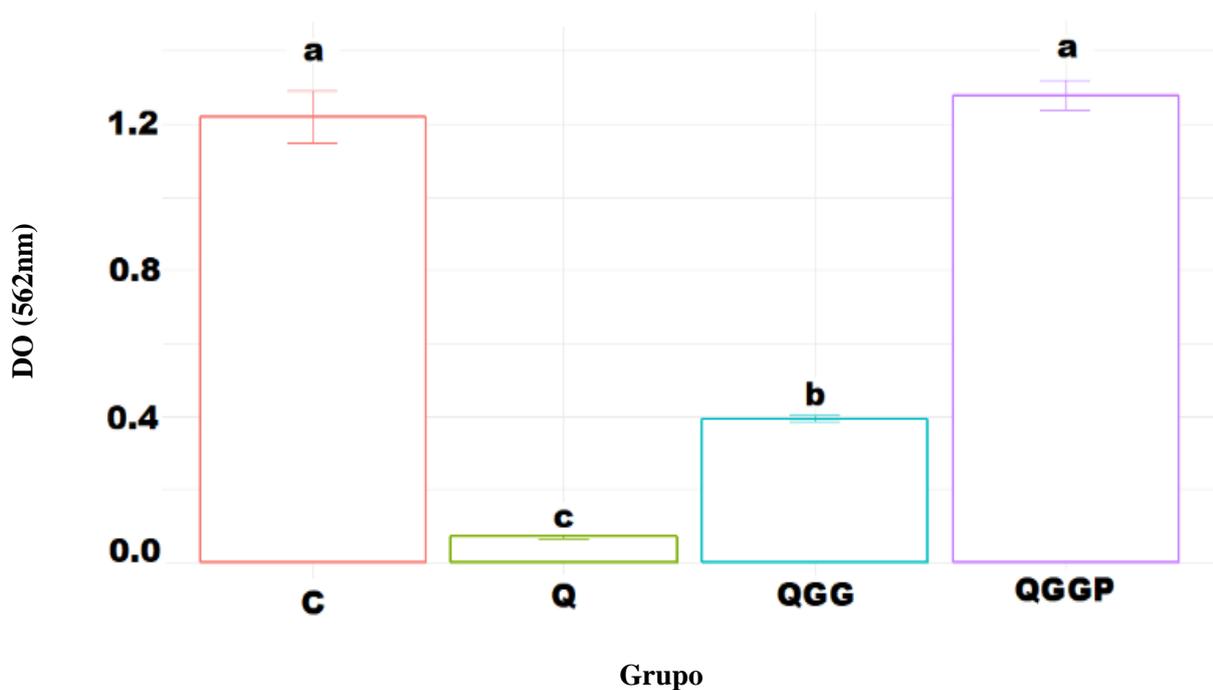


C – Células cultivadas em discos de poliestireno (Controle); Q - Quitosana; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGP - Quitosana, gelatina e dentina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. (*) representa diferença intragrupo ($p < 0.05$). Letras e símbolos diferentes representam diferença significativa entre grupos no tempo de 4 e 8 dias de cultivo, respectivamente ($p < 0.05$).

5.3.3 Diferenciação celular

As matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó induziram maior diferenciação celular com formação de nódulos de mineralização quando comparadas com as outras matrizes ($p < 0.05$), sendo semelhante ao grupo controle ($p > 0.05$). A reticulação com genipina associada com a adição de gelatina à quitosana promoveu maior diferenciação que a quitosana pura ($p < 0.05$), porém esta indução foi menor que o grupo controle e a matriz acrescida de dentina em pó ($p < 0.05$) (Figura 5.11).

Figura 5.11 – Densidade óptica da diferenciação celular nas matrizes.



C – Células cultivadas em discos de poliestireno (controle); Q – Quitosana; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGGP - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. ^{a-c} Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos ($p < 0.05$).

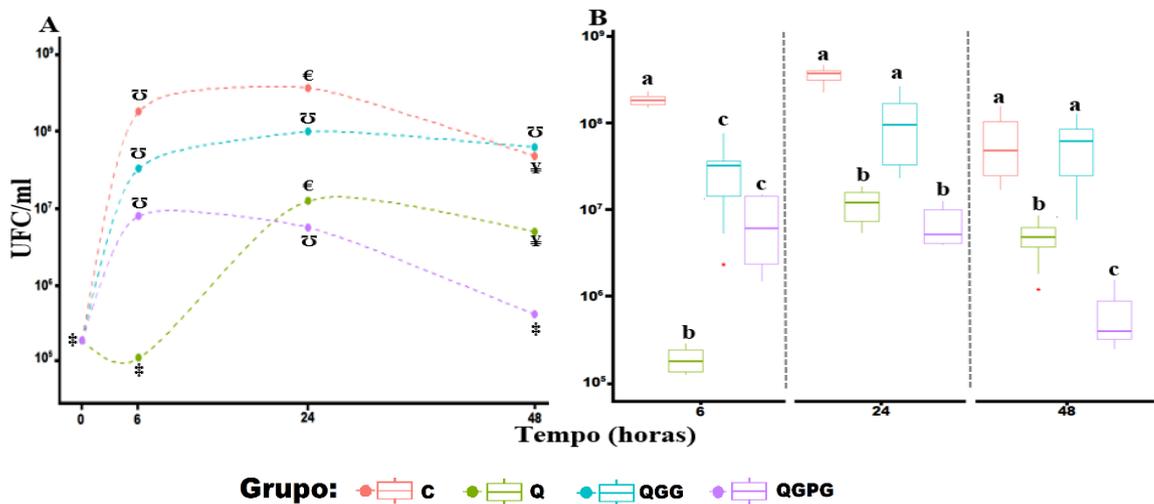
Fonte: O autor

5.4 Caracterização microbiológica *in vitro*

A presença das matrizes interferiu no crescimento normal dos *E. faecalis* em suspensão, sendo que em 6 horas de incubação as matrizes compostas de quitosana pura apresentaram menor quantidade de UFC/ml que as demais matrizes e o grupo controle ($p < 0.05$), sendo seu número semelhante à sua contagem inicial ($p > 0.05$). A quantidade bacteriana em presença da matriz reticulada de quitosana e gelatina com ou sem adição de dentina em pó foi semelhante entre si ($p > 0.05$), porém apresentou valores superiores à quitosana pura e inferiores ao controle neste tempo experimental ($p < 0.05$). Em 24 horas, a matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó e de quitosana pura foram semelhantes entre si ($p > 0.05$), porém com níveis inferiores de UFC quando comparado com a matriz não reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó e com o controle ($p < 0.05$). No entanto, em 48 horas, o menor número de UFC foi na presença da matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó ($p < 0.05$), valor que foi semelhante à sua contagem inicial ($p > 0.05$). O maior valor obtido neste tempo foi na presença da matriz não reticulada de quitosana e gelatina ($p < 0.05$), que foi semelhante ao controle ($p > 0.05$).

A comparação intra e entre grupos e a curva de crescimento bacteriano do *E. faecalis* na presença das diferentes matrizes de quitosana analisadas pode ser observada na figura 5.12.

Figura 5.12 - Curva de crescimento bacteriano (A) e Box Plot (B) do número de bactérias (UFC/ml) em suspensão coletadas do meio em presença das matrizes avaliadas em 6, 24 e 48 horas de contato

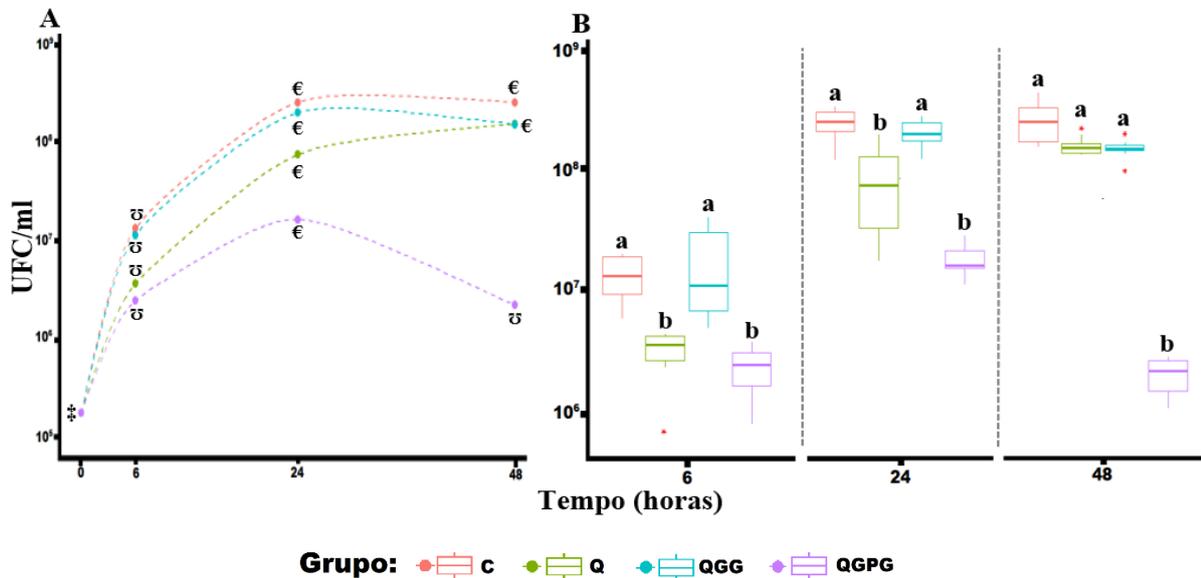


C – Bactérias em suspensão sem presença de matriz (controle); Q – Quitosana; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. Símbolos diferentes representam diferença intragrupo ($p < 0.05$). ^{a-c}Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos em diferentes tempos experimentais ($p < 0.05$).

Fonte: O autor

No que se refere à curva de crescimento resultante do contato de *E. faecalis* com derivados das matrizes, pôde-se observar que todos os grupos tiveram comportamento semelhante com crescimento significativo desde o tempo inicial até as 24 horas ($p > 0.05$). No entanto, somente o grupo da matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó teve redução significativa entre 24 e 48 horas ($p < 0.05$), sendo este valor semelhante à contagem no seu tempo experimental de 6 horas ($p > 0.05$). A contagem de UFC/ml nos tempos de 6 e 24 horas demonstrou menores médias nos grupos da matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó e de quitosana pura, apresentando diferença significativa com a matriz não reticulada de quitosana e gelatina e o grupo controle ($p < 0.05$). Já no tempo de 48 horas, somente a matriz reticulada de quitosana, gelatina e dentina em pó apresentou valor inferior ($p < 0.05$), sendo os demais grupos semelhantes entre si ($p > 0.05$) (Figura 5.13).

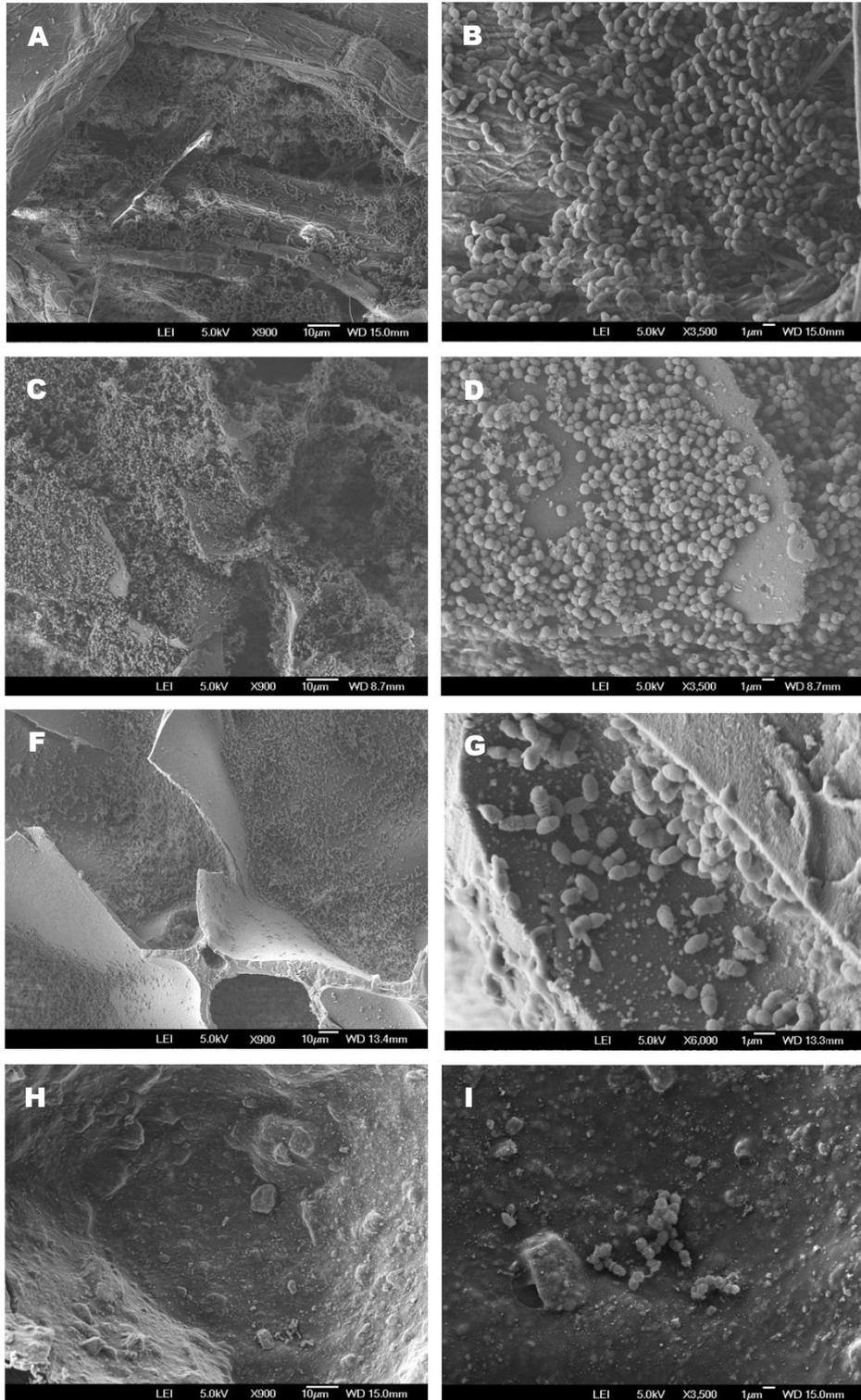
Figura 5.13 - Curva de crescimento bacteriano (A) e Box Plot (B) do número de bactérias (UFC/ml) em suspensão coletadas do meio acrescido com soro fisiológico condicionado com as diferentes matrizes avaliadas



C – Bactérias em suspensão sem presença de matriz (controle); Q – Quitosana; QGG – Quitosana e gelatina reticulada com genipina; QGPG - Quitosana, gelatina e dentina reticulada com genipina. Símbolos diferentes representam diferença intragrupo ($p < 0.05$). ^{a-b}Letras diferentes representam diferença significativa entre grupos em diferentes tempos experimentais ($p < 0.05$).

Fonte: O autor

Figura 5.14 – Eletromicrografias das bactérias na superfície das matrizes a 48 horas. Matrizes a base de quitosana pura (C,D). Matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina (F,G). Matrizes reticuladas a base de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó (H,I). Bactérias cultivadas em discos de celulose (A,B)



Fonte: O autor

A observação da superfície das matrizes após o cultivo bacteriano demonstrou a adesão das bactérias em todos os grupos, no entanto, quando a matriz foi reticulada, houve menor tendência de adesão, e a adição de dentina em pó limitou esta adesão (Figura 5.14).

6 DISCUSSÃO

As matrizes com uso potencial em endodontia regenerativa devem possuir características adequadas que permitam a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular para assim poderem regenerar os tecidos do complexo dentino-pulpar (Prescott et al., 2008; Huang et al., 2010; Kim et al., 2010; Nakashima et al., 2017; Galler et al., 2018; Widbiller et al., 2018b). Adicionalmente, é desejável que as matrizes apresentem atividade antimicrobiana para poder controlar o efeito deletério das bactérias residuais no processo de regeneração (Verma et al., 2017). Nisto, a fração orgânica da dentina humana tem em seu interior vários fatores de crescimento e peptídeos antimicrobianos fossilizados, que lhes conferem propriedades bioativas como a osteoindução, a formação de dentina reparadora, a neovascularização, a quimiotaxia celular e propriedades bacteriostáticas (Machado 1992; Machado et al., 2006; Smith et al., 2012a, Smith et al., 2012b; Widbiller et al., 2018b). No presente estudo, essas biomoléculas foram extraídas da dentina em pó e imobilizadas durante o processo de elaboração de matrizes de quitosana com associações, no qual se observou que quando reticulada resultou na adesão, proliferação e mineralização de células-tronco da papila apical dentária humana, no entanto, a incorporação da dentina em pó lhe conferiu atividade bacteriostática sobre *E. faecalis* em suspensão, e limitou a adesão dessas bactérias em sua superfície.

As matrizes estudadas foram elaboradas empregando o método de congelamento e liofilização obtendo matrizes sólidas porosas, resultado também observado por outros autores (Madhally; Matthew, 1999; O'Brien et al. 2005; Chen; Fan, 2007; Yang et al. 2012; Garg et al. 2012, Qu et al., 2015; Bellamy et al. 2016; Asghari Sana et al., 2017). Adicionalmente, pó de dentina humana foi obtida através de vários ciclos de moagem, e as partículas padronizadas em tamanho, obtendo diâmetros menores de 40 μm (Figura 5.1). Neste particular, Aubeaux et al. (2016) reportaram que o tamanho da partícula de pó influencia na quantidade de proteínas extraídas, onde maiores quantidades podem ser extraídas quando as partículas são menores que 150 μm de diâmetro. Assim, o diâmetro utilizado menor que 40 μm é adequado para favorecer a extração das proteínas contidas na matriz orgânica da dentina em pó, e permitir sua utilização em matrizes para endodontia regenerativa. As proteínas da dentina podem ser extraídas pela ação desmineralizadora de ácidos,

tais como o EDTA (Jones; Leaver 1974; Thomas; Leaver,1975; Smith et al., 1990; Finkelman et al.,1990; Bessho et al.1991; Martin-De Las Heras, et al. 2000; Zhang et al., 2011; Smith et al., 2012b Thomson et al. 2013; Ducan et al., 2017; Widbiller et al., 2017; Widbiller et al., 2018a), ácido clorídrico (Machado et al., 2013), ácido fosfórico (Salehi et al., 2016) e ácido cítrico (Ivica et al., 2019). No entanto, é importante estabelecer que a quitosana precisa de soluções com pH menor de 4,6 para sua dissolução, sendo o ácido acético amplamente empregado para esse fim (Suh; Matthew, 2000). Por este motivo, o ácido acético foi utilizado no presente ensaio para a extração de proteínas contidas na matriz orgânica da dentina em pó, fato que foi confirmado em estudo piloto previamente realizado (Apêndice A). Widbiller et al. (2017) reportaram que a energia ultrassônica potencializa a ação do EDTA na extração de proteínas da dentina humana. Assim, o ácido acético utilizado foi ultrassonificado para maior extração de proteínas da dentina em pó, ação também confirmada previamente no estudo piloto, em que as partículas de dentina em pó ultrassonificadas e agitadas no ácido acético obtiveram liberação de proteínas significativamente maior que quando somente eram agitadas ($p < 0.05$).

No que se refere à morfologia da matriz empregada, a porosidade é uma característica importante a ser avaliada porque influencia no comportamento celular. Assim, poros inferiores a 90 μm impedem a penetração celular e poros superiores a 500 μm inibem a adesão celular (O'Brien, et al., 2005; Garg, et al. 2012). Além disso, tem sido reportado na literatura que o tamanho médio superior a 150 μm e inferior de 400 μm permitem a adesão e proliferação de células-tronco de origem dental (Guan et al.,2015; Qu et al., 2015; Yu et al.,2019). No presente estudo as matrizes compostas de quitosana pura apresentaram poros com tamanho médio de 227 μm , entretanto, quando foi adicionada a gelatina, o tamanho dos poros aumentou para 240 μm , porém sem diferença significativa ($p > 0,05$). Aumento significativo a estes valores com média de 295 μm puderam ser observados com a adição da dentina em pó ($p < 0,05$). No entanto, os valores das cinco matrizes adquiridas estão dentro do intervalo entre 150 e 400 μm . Para limitar a rápida degradação da estrutura da matriz foi adicionado a genipina como reticulante. Nisto, pôde-se observar que a matriz de quitosana e gelatina obtiveram alteração do diâmetro de 240 μm para 211 μm quando reticulada, porém, sem diferença significativa entre os valores ($p > 0,05$). Nas matrizes com adição de dentina em pó esta alteração foi de 295 μm para 166 μm quando reticulada, sendo esse valor significativamente menor que todos os grupos ($p < 0,05$). Todavia, mesmo

assim, todas as matrizes desenvolvidas se apresentaram dentro do intervalo adequado para o crescimento celular. A rugosidade da superfície da matriz é outro ponto importante a ser analisado, pois segundo estudo de Kwon et al. (2015), o aumento da rugosidade superficial da matriz melhora a adesão e o comportamento celular. A adição de pó de dentina nas matrizes a base de quitosana e gelatina com reticulação ou não, resultou em superfícies rugosas quando observadas através de microscopia eletrônica de varredura, sugerindo ser um ambiente favorável para a regeneração endodôntica.

Dentro das características físico-químicas, a adequada taxa de degradação é fundamental para permitir a substituição da matriz pelos tecidos neoformados (Galler et al., 2011a). Palma et al. (2017) observaram que a presença de resíduos não degradados de matrizes compostas de quitosana e ácido hialurônico afetaram negativamente a regeneração no interior do canal radicular. No presente estudo, a degradação das matrizes foi avaliada através da perda de massa em contato com uma solução com composição acelular iônica semelhante ao plasma sanguíneo humano com adição de lisozima, conhecida enzima sanguínea que possui atividade de degradação sobre a quitosana (Brouwer et al., 1984; Oyane et al., 2002). Assim, a estrutura das matrizes que continham gelatina sem reticulação foi completamente degradada nos tempos iniciais entre o 2º e 8º dia do ensaio. Essa rápida degradação poderia ser explicada pela instabilidade química da estrutura formada pela matriz principal associada a um segundo composto e ausência de um agente reticulante (Moura et al., 2011; Kwon et al., 2015; Zhang et al., 2016), e a alta taxa de degradação que apresenta o colágeno e seus derivados como a gelatina (Huang et al., 2006; Qu et al., 2015). A rápida degradação da matriz no interior do canal radicular poderia levar ao deslocamento das células resultando em espaços vazios que comprometeriam a neoformação tecidual (Huang et al., 2006). Para limitar o efeito negativo da rápida degradação, a genipina foi utilizada como agente reticulante com base no estudo de Moura et al. (2011), que observaram a efetividade da reticulação da genipina sobre a matriz a base de quitosana e gelatina em forma de hidrogel. Adicionalmente, Kwon et al. (2015) demonstraram que a genipina possui biocompatibilidade superior aos reticulantes sintéticos e possui capacidade de induzir a diferenciação odontogênica de células-tronco da polpa dentária. Neste contexto, a reticulação utilizando genipina em matrizes compostas de quitosana no presente estudo obteve taxa de degradação significativamente menor com porcentual inferior de 42% no tempo experimental de

32 dias ($p < 0.05$). Contudo, embora tenha sido utilizada uma solução quimicamente semelhante ao plasma sanguíneo, estas informações *in vitro* necessitam ser corroboradas por ensaios *in vivo* para determinar se esta taxa de degradação das matrizes reticuladas é adequada ou não, para favorecer a regeneração no interior do canal radicular, na presença das células do sistema imunológico.

A taxa de embebição tem sua importância relacionada à troca de nutrientes e eliminação de subprodutos do metabolismo celular. Os resultados demonstraram que as matrizes de quitosana apresentaram menores taxas de embebição quando reticuladas ($p < 0.05$), sem diferença entre os tempos experimentais de 4 e 8 horas ($p > 0.05$). Nisto, pode-se inferir que a reticulação limitou a absorção de líquidos, atingindo equilíbrio hidroeletrolítico em 4 horas de contato. As matrizes não reticuladas avaliadas atingiram valores maiores ($p < 0.05$), porém, também adquirindo equilíbrio em 4 horas de contato. Diversos autores justificam o uso de hidrogéis devido à sua possível melhor adaptação no interior do canal radicular (Galler et al., 2011a; Rosa et al., 2013; Fukushima et al., 2019). Nesse sentido, a embebição apresentada pelas matrizes sólidas desenvolvidas seria favorável, uma vez que a expansão higroscópica observada poderia permitir melhor adaptação da matriz à parede do canal. No entanto, futuros estudos para confirmar esta hipótese e o valor ideal de expansão são recomendados.

A importância da liberação de proteínas da matriz dentinária está relacionada à presença de fatores de crescimento, isto porque dentre as diversas proteínas contidas na dentina, uma pequena fração corresponde a fatores de crescimento (Smith et al., 2016). A análise da curva de liberação de proteínas totais no decorrer do tempo demonstrou que com a exceção da quitosana pura e o controle negativo, todas as matrizes avaliadas liberaram proteínas do 1º ao 32º dia. Quando comparadas as matrizes com grau de degradação semelhante, observou-se que dentre as matrizes reticuladas e de quitosana pura, a adição de dentina em pó promoveu maior liberação de proteínas em todos os tempos experimentais ($p < 0,05$), o que sugere que uma fração destas proteínas liberadas é proveniente do pó de dentina adicionado na matriz. Estes resultados estão de acordo com Aubeux et al. (2016) que observaram que a incorporação de pó de dentina à matriz resultou na liberação de proteínas da parte orgânica da dentina em pó. As matrizes não reticuladas foram excluídas da comparação entre grupos devido à rápida degradação apresentada, que inviabilizaria sua utilização como matriz adequada para a regeneração.

Independente da composição das matrizes, elas e seus subprodutos de degradação não devem apresentar efeitos citotóxicos que poderiam interferir na regeneração dos tecidos. A viabilidade celular em presença do meio condicionado com as matrizes demonstrou que nenhum meio promoveu viabilidade celular inferior a 60%. Adicionalmente, observou-se contato íntimo das células com as matrizes. Assim, pode-se afirmar que tanto as matrizes como os subprodutos da sua degradação não apresentaram efeito citotóxico sobre as células tronco. No entanto, observou-se que a adição de dentina em pó promoveu maior viabilidade celular, que foi aumentada no tempo experimental de 48 horas ($p < 0,05$). Estes resultados podem estar relacionados com as proteínas liberadas da dentina em pó que foi observada no teste de liberação de proteínas totais.

Na engenharia tecidual, as células requerem um substrato para se aderir e permitir sua proliferação e diferenciação no tecido alvo (Galler et al., 2011a; Garg et al., 2012). No presente estudo, não foi observada adesão celular na matriz de quitosana pura, fato evidenciado pelas poucas células esferoidais visualizadas na sua superfície por meio de eletromicrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.9f). Esta falta de aderência pode ser justificada devido à sua baixa hidrofiliabilidade (Kim et al., 2009). Em concordância a estes resultados, Chen e Fan (2007), Kim et al. (2009) e Asghari Sana et al. (2017) também reportaram células esferoidais na superfície de matrizes de quitosana pura. Nas matrizes reticuladas com genipina compostas por quitosana e gelatina observou-se a adesão de algumas células-tronco, fato evidenciado pela presença de células espreiadas na superfície da matriz (Figura 5.9h). Isto pode-se explicado pela a adição de gelatina, a qual é composta pela sequência de peptídeos arginina-glicina-ácido aspártico que modulam a adesão celular (Asghari Sana et al., 2017). Além disso, a reticulação das matrizes também pode ter contribuído na adesão celular através da melhoria das características físico-químicas da matriz (Qu et al., 2015; Zhang et al., 2016; Kwon et al., 2015). Já nas matrizes reticuladas compostas por quitosana e gelatina com adição de dentina em pó, as células-tronco apresentaram-se espreiadas com morfologia semelhante aos fibroblastos com presença de numerosos filamentos – filopódios – estabelecendo contato com outras células e à superfície do material. Ainda, no oitavo dia, essas células cobriram completamente a superfície da matriz, o que evidencia uma adequada adesão celular nesse substrato (Figura 5.9j). Desta forma, a incorporação de dentina em pó melhorou notavelmente a adesão celular nas matrizes,

possivelmente devido à rugosidade da superfície dessas matrizes, uma vez que é conhecido que o aumento da rugosidade do substrato potencializa a adesão celular (Kwon et al., 2015; Ivica et al., 2019).

No que se refere à proliferação celular, a mesma foi avaliada por meio da viabilidade celular entre os tempos de 4 e 8 dias. Nisto, observou-se que os grupos de matrizes reticuladas tiveram maior proliferação em relação à quitosana pura ($p < 0,05$), e que a adição de dentina em pó aumentou significativamente a proliferação ($p < 0,05$). Estes achados têm seu contexto baseado na capacidade da genipina em contribuir na proliferação de células-tronco (Kwon et al., 2015). Adicionalmente, fatores de crescimento podem ter sido extraídos da dentina em pó pela ação do ácido acético empregado para a dissolução da quitosana, o que justifica maiores valores no grupo contendo dentina em pó ($p < 0,05$). Nisto, Galler et al. (2018) demonstraram que extratos dentinários promovem a proliferação de células inoculadas na matriz, e conseqüentemente favorecem a neoformação tecidual. No entanto, os autores destacaram que para que haja regeneração pulpar, estes extratos – proteínas bioativas – necessitam ser imobilizadas na estrutura da matriz. Neste particular, é conhecida a capacidade endógena da quitosana de se ligar aos fatores de crescimento (Kim et al., 2008; Yang et al., 2012; Bellamy et al., 2016). Assim, a quitosana empregada como base para a elaboração da matriz resultou na fixação das proteínas extraídas da dentina bem como sua liberação controlada. A comparação entre os tempos demonstrou ausência de proliferação entre o 4° e 8° dia, provavelmente devido à falta de adesão celular na superfície da matriz visto por microscopia eletrônica de varredura.

A diferenciação de células-tronco da papila dental inoculadas nas diferentes matrizes foi avaliada por meio da capacidade de formação de nódulos mineralizados corados por vermelho de alizarina. Assim, a formação destes nódulos na matriz reticulada com adição de dentina em pó foi significativamente maior que quando comparado com as outras matrizes ($p < 0,05$). O efeito osteoindutor da dentina é amplamente conhecido (Machado, 1992; Machado et al., 2006), no qual se deve à presença de fatores de crescimento fossilizados na matriz orgânica da dentina (Smith et al., 1990; Finkelman et al., 1990; Bessho et al., 1991; Zhang et al., 2011; Thomson et al., 2013; Smith et al., 2016; Duncan et al., 2017; Widbiller et al., 2017). A incorporação desses fatores durante o processo de elaboração da matriz, e posterior liberação, pode explicar o resultado obtido neste estudo.

A matriz reticulada de quitosana e gelatina induziu a formação de nódulos de mineralização em quantidade significativamente maiores que a matriz de quitosana pura ($p < 0.05$) e menores que a matriz com adição de dentina em pó ($p < 0.05$). Tem sido reportado que a genipina induz a formação de tecidos mineralizados a partir de células-tronco de origem dentária em matrizes compostas de colágeno (Kwon et al., 2015). No presente estudo, esse mesmo efeito também foi observado.

Matrizes compostas com potencial antibacteriano é anseio de estudos buscando regeneração endodôntica (Chatzistavrou et al. 2014; Kwon et al. 2017; Ducret et al. 2019), no entanto, esta propriedade sendo avaliada com os compostos da matriz de forma conjunta, bem como sua interação com as demais propriedades biológicas e físico-química da matriz tem sido pouco explorada. No presente estudo, foi observada a normalidade da curva de crescimento do *E. faecalis* no grupo controle, composta da fase logarítmica nas seis primeiras horas, seguido da fase estacionária com duração de 24 horas, e posterior declínio a partir de 24 horas conforme descrito na literatura (Portenier et al., 2005). Com base nesta curva, pôde-se observar que a presença da matriz de quitosana pura apresentou comportamento diferente, retardando a fase logarítmica com início em 6 horas e término em 24 horas. As soluções de quitosana possui efeito antibacteriano reconhecido por estudos prévios (Kim et al., 1997; Fei Liu et al., 2000), contudo esse efeito é influenciado por fatores intrínsecos como a fonte de obtenção, grau de desacetilação, peso molecular, pH e associações com outras substâncias (Hosseinnejad e Jafari, 2016). Além disso, Sarasam et al. (2008) observaram que o efeito antibacteriano da quitosana sobre patógenos orais é contato dependente. Assim, a atividade antimicrobiana da quitosana pura nas primeiras 6 horas poderia ser explicada pela sua alta taxa de embebição que atingiu equilíbrio em 4 horas. Esta embebição pode ter resultado na maior área de contato da matriz com a suspensão bacteriana nas primeiras 6 horas. Todavia, a quitosana quando reticulada obteve comportamento semelhante ao grupo controle na fase logarítmica, pois houve a presença de crescimento significativo do número de bactérias em relação ao tempo inicial ($p < 0,05$), porém, menor que o controle ($p < 0,05$). A comparação deste grupo com a quitosana pura demonstrou menor efeito antibacteriano ($p < 0,05$), fato que poderia estar relacionado à sua menor taxa de embebição ($p < 0,05$). Além disso, menores taxas de degradação conferida às matrizes reticuladas podem ter limitado a disponibilidade de quitosana na solução, e consequentemente o efeito antibacteriano desta por ser contato dependente. A

observação da fase de declínio representada no tempo de 48 horas demonstrou que a adição de dentina em pó promoveu menor número bacteriano quando comparado aos outros grupos e ao controle ($p < 0,05$), com nível semelhante à contagem inicial ($p > 0,05$). Nisto, Smith et al. (2012b) observaram em seu estudo que a fração orgânica da dentina humana contém peptídeos antimicrobianos com atividade bacteriostática sobre bactérias gram positivas comumente encontradas na cavidade oral, em específico o *S. mutans*, *S. oralis* e *E. faecalis*. Os resultados de atividade antimicrobiana obtidos no presente estudo poderiam ser explicados pela adequada extração, incorporação e imobilização desses peptídeos antimicrobianos durante o processo de elaboração da matriz. Assim, a incorporação de dentina em pó conferiu atividade bacteriostática sobre o *E. faecalis*. A interação da atividade antimicrobiana com as propriedades físico-química da matriz permite inferir que o declínio bacteriano entre 24 e 48 horas no grupo com a presença de dentina em pó está relacionado com a liberação de proteínas da matriz neste mesmo período.

A segunda parte do ensaio antibacteriano promoveu o contato de subprodutos da matriz com o *E. faecalis*, no qual demonstrou que todos grupos apresentaram crescimento bacteriano significativo do tempo inicial até as 24 horas ($p < 0,05$), sendo que somente o grupo utilizando meio condicionado com matriz adicionada de dentina em pó obteve declínio significativo entre 24 e 48 horas ($p < 0,05$), o que sugere que peptídeos imobilizados podem ser liberados ao meio mantendo sua atividade antimicrobiana prolongada. O meio condicionado com a matriz reticulada de quitosana e gelatina e de quitosana pura não reduziu significativamente o crescimento bacteriano ($p > 0,05$), Isto pode ter ocorrido devido à taxa de degradação de ambas as matrizes. Assim, o meio condicionado provavelmente poderia não possuir a quantidade necessária de quitosana para inibir o crescimento bacteriano.

Adicionalmente, foi observado pela microscopia eletrônica de varredura que na superfície das matrizes reticuladas de quitosana e gelatina e de quitosana pura houve a presença de numerosas bactérias aderidas. Todavia, a adição de dentina em pó resultou na adesão limitada de bactérias à superfície da matriz, provavelmente, também pela presença de peptídeos imobilizados na matriz desenvolvida.

Levando em consideração todas as características ideais que as matrizes devem possuir, a matriz reticulada a base de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó desenvolvida no presente estudo tem potencial para ser empregada na regeneração das estruturas do complexo dentino pulpar, já que apresenta efeito

bacteriostático e ao mesmo tempo, é adequada para o desenvolvimento celular. No entanto, apesar dos resultados promissórios observados, são necessários estudos *in vivo*, que primeiramente empreguem modelos experimentais em animais, para simular as condições clínicas e observar o comportamento do sistema imunológico do hospedeiro, com o intuito de corroborar os achados do presente estudo *in vitro*. Esses estudos contribuirão para o melhor conhecimento de matrizes compostas de quitosana associadas a biomoléculas da dentina em pó, e que por consequência, podem levar à regeneração endodôntica.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e pela natureza das metodologias aplicadas pode-se concluir que;

- Todas as matrizes analisadas apresentaram características morfológicas adequadas para o crescimento celular;
- A adição de gelatina aumenta a taxa de degradação da matriz de quitosana.
- A reticulação com genipina das matrizes compostas de quitosana e gelatina reduz a taxa de degradação e embebição;
- A adição de dentina em pó nas matrizes reticuladas compostas de quitosana e gelatina permite a liberação prolongada de proteínas da matriz orgânica da dentina incorporada;
- Todas as matrizes avaliadas assim como seus subprodutos da degradação são biocompatíveis;
- A adição de dentina em pó nas matrizes reticuladas compostas de quitosana e gelatina melhora a adesão, proliferação e diferenciação celular na matriz;
- A adição de dentina em pó nas matrizes reticuladas compostas de quitosana e gelatina lhe confere efeito bacteriostático a matriz e limita a adesão de bactérias na sua superfície;
- A matriz reticulada com genipina composta de quitosana e gelatina com adição de dentina em pó apresenta características morfológicas, físico-químicas, biológicas e antimicrobianas adequadas para seu potencial emprego na terapia endodôntica regenerativa.

REFERÊNCIAS¹

Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Sci Int.* 2007 May; 4(1):45-58.

Asghari Sana F, Çapkın Yurtsever M, Kaynak Bayrak G, Tunçay EÖ, Kiremitçi AS, Gümüşderelioğlu M. Spreading, proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells on chitosan scaffolds immobilized with RGD or fibronectin. *Cytotechnology.* 2017 Aug;69(4):617-30.

Aubeux D, Beck L, Weiss P, Guicheux J, Enkel B, Pérez F, Simon S. Assessment and quantification of noncollagenic matrix proteins released from human dentin powder incorporated into a silylated hydroxypropylmethylcellulose biomedical hydrogel. *J Endod.* 2016 Sep;42(9):1371-6.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod.* 2004 Apr;30(4):196-200.

Bellamy C, Shrestha S, Torneck C, Kishen A. Effects of a bioactive scaffold containing a sustained transforming growth factor- β 1-releasing nanoparticle system on the migration and differentiation of stem cells from the apical papilla. *J Endod.* 2016 Sep;42(9):1385-92.

Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1991 Mar;70(3):171-5.

Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: The first decade and beyond. *J Cell Biochem.* 1998;72 Suppl 30-31(S30-31):297-303.

Brouwer J, van Leeuwen-Herbets T, Otting-van de Ruit M. Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta.* 1984 Sep;142(1):21-30.

Chatzistavrou X, Fenno JC, Faulk D, Badylak S, Kasuga T, Boccaccini AR, Papagerakis P. Fabrication and characterization of bioactive and antibacterial composites for dental applications. *Acta Biomater.* 2014 Aug;10(8):3723-32.

¹ ¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Chen H, Fan M. Chitosan/carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complex scaffolds for pulp cells regeneration. *J Bioact Compat Polym*. 2007 Sep;22(5):475-91.

Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pulpal necrosis and apical periodontitis. *J Endod*. 2017 Apr;43(4):561-7.

de Cara SPHM, Origassa CST, de Sá Silva F, Moreira MSNA, de Almeida DC, Pedroni ACF, Carvalho GL, Cury DP, Câmara NOS, Marques MM. Angiogenic properties of dental pulp stem cells conditioned medium on endothelial cells in vitro and in rodent orthotopic dental pulp regeneration. *Heliyon*. 2019 Apr 28;5(4):e01560.

Ducret M, Montembault A, Josse J, Padeloup M, Celle A, Benchrih R, Mallein-Gerin F, Alliot-Licht B, David L, Farges JC. Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dent Mater*. 2019 Apr;35(4):523-33.

Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Reid C, Smith G, Cooper PR. Release of bio-active dentine extracellular matrix components by histone deacetylase inhibitors (HDACi). *Int Endod J*. 2017 Jan;50(1):24-38.

Fei Liu X, Lin Guan Y, Zhi Yang D, Li Z, De Yao K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci*. 2001 Feb;79(7):1324-35.

Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*. 1990 Jul;5(7):717-23.

Fukushima KA, Marques MM, Tedesco TK, Carvalho GL, Gonçalves F, Caballero-Flores H, Morimoto S, Moreira MS. Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration-A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2019 Feb;98:182-94.

Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*. 2011a Jul;23(3):333-9.

Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod.* 2011b Nov;37(11):1536-41.

Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2012 Jan;18(1-2):176-84.

Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod.* 2014 Apr;40(4 Suppl):S41-5.

Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod.* 2015 Mar;41(3):363-8.

Galler KM, Brandl FP, Kirchhof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W, Göpferich A, Schmalz G. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2018 Feb;24(3-4):234-44.

Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012;29(1):1-63.

Gu K, Chang SR, Slaven MS, Clarkson BH, Rutherford RB, Ritchie HH. Human dentin phosphophoryn nucleotide and amino acid sequence. *Eur J Oral Sci.* 1998 Dec;106(6):1043-7. Erratum in: *Eur J Oral Sci* 1999 Apr;107(2):154.

Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *Eur J Oral Sci.* 2000 Feb;108(1):35-42.

Guan Z, Shi S, Samruajbenjakun B, Kamolmatyakul S. Fabrication, characterization and cell cultures on a novel chitosan scaffold. *Biomed Mater Eng.* 2015;25(1 Suppl):121-35.

Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res.* 2012 Mar;91(3):227-34.

Ham JW, Patterson SS, Mitchell DF. Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972 Mar;33(3):438-49.

Hosseinnejad M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int J Biol Macromol*. 2016 Apr;85:467-75.

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006 May;324(2):225-36.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):605-15.

Ivica A, Zehnder M, Mateos JM, Ghayor C, Weber FE. Biomimetic conditioning of human dentin using citric acid. *J Endod*. 2019 Jan;45(1):45-50.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):185-7.

Jones IL, Leaver AG. Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. *Arch Oral Biol*. 1974 May;19(5):371-80.

Kim CH, Choi JW, Chun HJ, Choi KS. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. *Polymer Bulletin*. 1997 Apr; 38(4):387-93.

Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2008 Jan-Feb;26(1):1-21.

Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Nov;108(5):e94-100.

Kim JY, Xin X, Molioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, Fu SY, Koch PD, Mao JJ. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A*. 2010 Oct;16(10):3023-31.

Kwon YS, Lim ES, Kim HM, Hwang YC, Lee KW, Min KS. Genipin, a cross-linking agent, promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2015 Apr;41(4):501-7.

Kwon YS, Kim HJ, Hwang YC, Rosa V, Yu MK, Min KS. Effects of epigallocatechin gallate, an antibacterial cross-linking agent, on proliferation and differentiation of human dental pulp cells cultured in collagen scaffolds. *J Endod.* 2017 Feb;43(2):289-96.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May;260:920-6.
Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec.* 1989 Jun;224(2):154-66.

Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):133-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Machado MEL. Considerações em torno da capacidade indutora da dentina na formação de tecidos duros e sua possível utilização no tratamento endodôntico [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1992.

Machado ME, Souza AS, Araújo VC. Histological evaluation of the osteoinduction capability of human dentine. *Int Endod J.* 2006 Nov;39(11):855-9.

Machado MEL, Marques VDD, Nabeshima CK. Histological evaluation of the osteoinductive potential of demineralized dentin matrix. *Rev Odonto Ciênc.* 2013 Jan;28(1):8-12.

Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 1999 Jun;20(12):1133-42.

Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod.* 2013 Jan;39(1):138-44.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000 Sep;45(9):757-65.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007 May;86(5):436-40. Erratum in: *J Dent Res.* 2007 Aug;86(8):792.

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996 Nov-Dec;12(6):865-8.

Moreira MS, Diniz IM, Rodrigues MF, de Carvalho RA, de Almeida Carrer FC, Neves II, Gavini G, Marques MM. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2017 Jan;166:180-6.

Moura MJ, Faneca H, Lima MP, Gil MH, Figueiredo MM. In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules.* 2011 Sep;12(9):3275-84.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007 Apr;33(4):377-90.

Myers WC, Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974 Mar;37(3):441-50.

Nabeshima CK, Valdivia JE, Caballero-Flores H, Arana-Chavez VE, Machado MEL. Immunohistological study of the effect of vascular Endothelial Growth Factor on the angiogenesis of mature root canals in rat molars. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170437.

Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):778-83.

Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):192-8.

Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Mar 9;8(1):61.

Nevins AJ, Finkelstein F, Borden BG, Laporta R. Revitalization of pulpless open apex teeth in rhesus monkeys, using collagen-calcium phosphate gel. *J Endod.* 1976 Jun;2(6):159-65.

Nevins A, Wrobel W, Valachovic R, Finkelstein F. Hard tissue induction into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel. *J Endod.* 1977 Nov;3(11):431-3.

Nevins AJ, LaPorta RF, Borden BG, Spangberg LS. Pulpotomy and partial pulpectomy procedures in monkey teeth using cross-linked collagen-calcium phosphate gel. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980 Apr;49(4):360-5.

Nieto-Suárez M, López-Quintela MA, Lazzari M. Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydr Polym.* 2016 May;141:175-83.

Nosrat A, Kolahehdouzan A, Khatibi AH, Verma P, Jamshidi D, Nevins AJ, Torabinejad M. Clinical, Radiographic, and Histologic Outcome of Regenerative endodontic treatment in human teeth using a novel collagen-hydroxyapatite scaffold. *J Endod.* 2019 Feb;45(2):136-43.

O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials.* 2005 Feb;26(4):433-41.

Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961 Dec;19:324-53.

Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res A.* 2003 May;65(2):188-95.

Palma PJ, Ramos JC, Martins JB, Diogenes A, Figueiredo MH, Ferreira P, Viegas C, Santos JM. Histologic evaluation of regenerative endodontic procedures with the use of chitosan scaffolds in immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1279-87.

Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod.* 2005 May;31(5):380-6.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod.* 2008 Apr;34(4):421-6.

Qu T, Jing J, Ren Y, Ma C, Feng JQ, Yu Q, Liu X. Complete pulpodentin complex regeneration by modulating the stiffness of biomimetic matrix. *Acta Biomater.* 2015 Apr;16:60-70.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000 Nov;45(11):1013-6.

Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res.* 2013 Nov;92(11):970-5.

Salehi S, Cooper P, Smith A, Ferracane J. Dentin matrix components extracted with phosphoric acid enhance cell proliferation and mineralization. *Dent Mater.* 2016 Mar;32(3):334-42.

Saltzman WM. Growth-factor delivery in tissue engineering. *MRS Bulletin.* 1996 Nov;21 (11):62–5.

Sarasam AR, Brown P, Khajotia SS, Dmytryk JJ, Madihally SV. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Mar;19(3):1083-90.

Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale.* 1990 Jun;18(2):123-9.

Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Bégue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995;32(1-4):291-6.

Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003 Jun;67(6):678-89.

Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol.* 2012a Feb;57(2):109-21.

Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR. Antibacterial activity of dentine and pulp extracellular matrix extracts. *Int Endod J.* 2012b Aug;45(8):749-55.

Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the bioactive properties of the dentin-pulp complex in regenerative endodontics. *J Endod.* 2016 Jan;42(1):47-56.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):166-71.

Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(24):2589-98.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002 Sep;81(9):603-7.

Thomas M, Leaver AG. Identification and estimation of plasma proteins in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1975 Mar;20(3):217-8.

Tomson PL, Lumley PJ, Alexander MY, Smith AJ, Cooper PR. Hepatocyte growth factor is sequestered in dentine matrix and promotes regeneration-associated events in dental pulp cells. *Cytokine.* 2013 Feb;61(2):622-9.

Tseng HJ, Tsou TL, Wang HJ, Hsu SH. Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013 Jan;7(1):20-31.

Verma P, Nosrat A, Kim JR, Price JB, Wang P, Bair E, Xu HH, Fouad AF. Effect of residual bacteria on the outcome of pulp regeneration in vivo. *J Dent Res*. 2017 Jan;96(1):100-6.

Vidair RV, Butcher EO. Regeneration of tissue into the pulp canal of monkey's teeth. *J Dent Med*. 1955 Jan;10(1):163-6.

Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia CO, Diogenes A, Ruparel SB, Kolodrubetz D, Ruparel NB. Effect of bacterial biofilm on the osteogenic differentiation of stem cells of apical papilla. *J Endod*. 2017 Jun;43(6):916-22.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):56-63.

Widbiller M, Eidt A, Hiller KA, Buchalla W, Schmalz G, Galler KM. Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. *Clin Oral Investig*. 2017 Apr;21(3):879-88.

Widbiller M, Eidt A, Lindner SR, Hiller KA, Schweikl H, Buchalla W, Galler KM. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *Int Endod J*. 2018a May;51 Suppl 4:e278-e290.

Widbiller M, Driesen RB, Eidt A, Lambrichts I, Hiller KA, Buchalla W, Schmalz G, Galler KM. Cell homing for pulp tissue engineering with endogenous dentin matrix proteins. *J Endod*. 2018b Jun;44(6):956-62.e2.

Widbiller M, Eidt A, Wölflick M, Lindner SR, Schweikl H, Hiller KA, Buchalla W, Galler KM. Interactive effects of LPS and dentine matrix proteins on human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2018c Aug;51(8):877-888.

Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, Teixeira FB, Yamauchi M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):390-7.

Yang X, Han G, Pang X, Fan M. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Feb 18.

Yu H, Zhang X, Song W, Pan T, Wang H, Ning T, Wei Q, Xu HHK, Wu B, Ma D. Effects of 3-dimensional bioprinting alginate/gelatin hydrogel scaffold extract on proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells. *J Endod.* 2019 Jun;45(6):706-15.

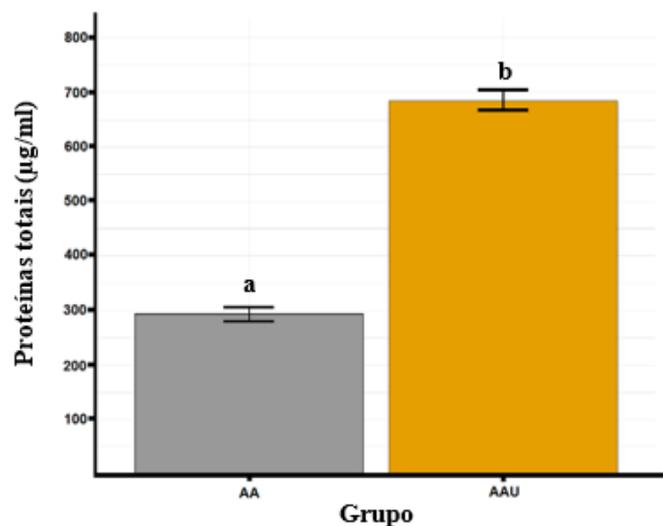
Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials.* 2006 Nov;27(33):5658-68.

Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod.* 2011 Jan;37(1):26-30.

Zhang Y, Wang QS, Yan K, Qi Y, Wang GF, Cui YL. Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Aug;104(8):1863-70.

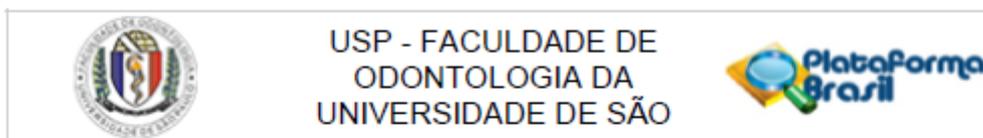
APENDICE A - Avaliação da capacidade de extração de proteínas do ácido acético

Para a avaliação da capacidade de extração das proteínas contidas na matriz orgânica do pó de dentina pelo ácido acético, foram testadas duas abordagens: no grupo AA, o pó de dentina foi mantido em solução de ácido acético 1% sob constante agitação por 4 horas empregando um agitador magnético; no grupo AAU, o pó de dentina foi mantido em solução de ácido acético 1% no interior de uma cuba ultrassônica sob constante agitação por 4 horas empregando um misturador de bancada acionado a 1000 rpm. Em todos os grupos a concentração de pó de dentina na solução foi de 15% p/v. Como controle negativo foi empregado solução de ácido acético 1% sem adição de pó de dentina sob agitação constante por 4 horas. Após, as soluções de cada grupo foram coletadas e centrifugadas a 4000 rpm por 20 min a 4°C. Então, os extratos obtidos foram congelados a -80°C e armazenados até sua análise. Cada grupo foi composto por 4 extratos preparados em tempos diferentes. A quantidade de proteínas totais presentes no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry et al. (1961).



Assim, observou-se que o ácido acético promove a liberação das proteínas da matriz orgânica do pó de dentina, sendo que o emprego de ultrassom resultou numa liberação significativamente maior (Teste T; $p < 0,00001$).

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e caracterização de matrizes tridimensionais porosas a base de quitosana, gelatina e dentina em pó para aplicação em endodontia regenerativa.

Pesquisador: Hector Valentin Caballero Flores

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89670218.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

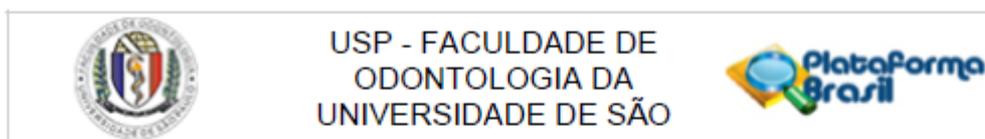
Número do Parecer: 2.745.544

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores citam que "A terapia endodôntica regenerativa visa substituir as estruturas danificadas do complexo detino-pulpar através de diferentes procedimentos biológicos norteados pelos princípios da engenharia de tecidos (Nakashima, 2005). Assim, para a regeneração dos tecidos acontecer é necessária uma fonte apropriada de células tronco, fatores de crescimento que sinalizem a diferenciação celular e matrizes que criem um microambiente favorável para a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (Murray et al., 2007)".

E a pesquisa apresentada: "Matrizes tridimensionais porosas serão confeccionadas a base de blendas de quitosano 2% reticuladas ou não com 0,01% de genipin, com a adição ou não de 20% de solução de gelatina na proporção de 1:1,2:1 e 1:2 (v / v) e com a adição ou não de dentina em pó. Subsequentemente, serão avaliadas as características morfológicas, físico-químicas e biológicas das matrizes confeccionada. A caracterização biológica In Vitro avaliará a citotoxicidade, proliferação e diferenciação das células tronco da papila apical (hSCAPs) nas matrizes. A caracterização biológica In Vivo avaliará a biocompatibilidade e degradação das matrizes implantadas no interior de tubos de dentina no espaço subcutâneo do dorso de ratos da linhagem Wistar."

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



Continuação do Parecer: 2.745.544

Objetivo da Pesquisa:

São citados pelos pesquisadores:

"Hipótese: A adição de gelatina melhora as características morfológicas, físico-químicas e biológicas das matrizes a base de quitosana e a adição de dentina em pó resulta na funcionalização das matrizes devido a liberação dos factores de crescimento contidos no pó de dentina.

Objetivo Primário: O objetivo do estudo será elaborar e analisar as características morfológicas, físico-químicas e biológicas das matrizes tridimensionais porosas a base de quitosana, gelatina e dentina em pó."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São citados pelos pesquisadores:

"Riscos: Proprios da cirurgia de terceiros molares inclusos.

Benefícios: Desenvolver e caracterizar biomateriais com uso potencial na endodontia regenerativa."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores citam que "Serão coletados 20 terceiros molares inclusos com apicogênese completa doados voluntariamente logo após da extração para a elaboração da dentina em pó coronaria e tubos de dentina radicular." E ainda "Serão coletados 2 terceiros molares inclusos com apicogênese incompleta de pacientes doados voluntariamente logo após da extração (motivo ortodôntico/preventivo) para o isolamento das hSCAPs."

Os pesquisadores apresentam TCLEs específicos para cada coleta.

São citados pelos pesquisadores que haverá retenção de amostras para armazenamento em banco. Sendo colocado como justificativa "As células utilizadas para a finalidade desta pesquisa serão descartadas em lixo apropriado após o término do estudo. No entanto, se autorizado pelo paciente no TCLE, as células-tronco que sobraem poderão ser congeladas por período de até 20 anos para serem utilizadas em pesquisas futuras que poderão ser conduzidas para testar efeitos celulares provocados por fitoterápicos, materiais dentários e outros biomateriais."

Lembrando que para ser utilizadas em novas pesquisas precisa dar entrada ao novo projeto de pesquisa e ter aprovação do CEP novamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta:

Autorização para uso da Clínica Odontológica da FOUASP;

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



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.745.544

2 TCLEs, específicos para doação de dentes para uso de dentina e uso de células;

Folha de rosto;

Projeto anexado;

Cronograma.

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:

Os pesquisadores citam que haverá retenção de amostras para armazenamento em banco, desde que o paciente autorize no TCLE, "as células-tronco que sobram poderão ser congeladas por período de até 20 anos para serem utilizadas em pesquisas futuras que poderão ser conduzidas para testar efeitos celulares provocados por fitoterápicos, materiais dentários e outros biomateriais."

Lembrando que para ser utilizadas em novas pesquisas precisa dar entrada ao novo projeto de pesquisa e ter aprovação do CEP novamente.

Os pesquisadores citam "A caracterização biológica In Vivo avaliará a biocompatibilidade e degradação das matrizes implantadas no interior de tubos de dentina no espaço subcutâneo do dorso de ratos da linhagem Wistar."

Esta parte da pesquisa precisa de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.

Os pesquisadores citam "A caracterização biológica In Vivo avaliará a biocompatibilidade e degradação das matrizes implantadas no interior de tubos de dentina no espaço subcutâneo do dorso de ratos da linhagem Wistar."

Esta parte da pesquisa precisa de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.

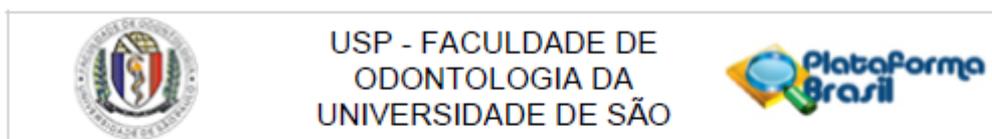
Projeto de pesquisa sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1131205.pdf	15/05/2018 10:48:05		Aceito

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: cepto@usp.br



Continuação do Parecer: 2.745.544

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	15/05/2018 10:48:04	Hector Valentin Caballero Flores	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dentina.docx	15/05/2018 10:45:43	Hector Valentin Caballero Flores	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Celulas.docx	15/05/2018 10:45:27	Hector Valentin Caballero Flores	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	14/05/2018 01:10:32	Hector Valentin Caballero Flores	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeautorizacao.pdf	14/05/2018 01:09:00	Hector Valentin Caballero Flores	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/05/2018 00:58:22	Hector Valentin Caballero Flores	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)