

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/02/2023.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ester Alves Ferreira Bordini

Engenharia tecidual e biotecnologia aplicadas no desenvolvimento de scaffolds multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa

Araraquara
2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ester Alves Ferreira Bordini

Engenharia tecidual e biotecnologia aplicadas no desenvolvimento de scaffolds multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.

Orientador: Profa. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos

Araraquara
2021

B729e Bordini, Ester Alves Ferreira
Engenharia tecidual e biotecnologia aplicadas no desenvolvimento de scaffolds multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa / Ester Alves Ferreira Bordini. -- Araraquara, 2021
115 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Diana Gabriela Soares dos Passos

1. Medicina Regenerativa. 2. Engenharia Tecidual. 3. Dentina. I. Título.

Ester Alves Ferreira Bordini

Engenharia tecidual e biotecnologia aplicadas no desenvolvimento de scaffolds multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

3º Examinador: Profa. Dra. Débora Lopes Salles Scheffel

4º Examinador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

5º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Araraquara, 02 de fevereiro de 2021.

DADOS CURRICULARES

Ester Alves Ferreira Bordini

NASCIMENTO	17 de maio de 1991 Taquaritinga – SP
FILIAÇÃO	Neuclair Bordini Júnior Alessandra Henriqueta Alves Ferreira
2009-2013	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/Unesp
2014-2016	Mestrado em Odontologia, Área de concentração em Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/Unesp
2018-2019	Doutorado em Reabilitação oral, Área de concentração em Prótese com Período Sanduíche pela University of Michigan, School of Dentistry – UofM
2017-2017	Estágio de docência em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/Unesp
2017-2017	Estágio de docência em Prótese Parcial Removível II pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/Unesp
2018-2018	Estágio de docência em Prótese Total II pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/Unesp
2018-2018	Colaborador docente junto à disciplina de Engenharia Tecidual Aplicada à Odontologia, oferecida no programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/Unesp

DEDICO ESTE TRABALHO...

À Deus,

Por não me desamparar e sempre ser meu sustento e minha provisão. Por preparar todos os meus caminhos e colocar as pessoas certas ao meu lado para percorrer e concluir esta jornada com maestria. Obrigada meu Deus por me capacitar mesmo em meio as provações. Sem Ti eu nada sou.

“Ó SENHOR, tua é a grandeza, o poder, a glória, a vitória e a majestade, porque tudo quanto há no céu e na terra a ti pertence”. I Crônicas 29:11

À minha mãe,

Por ser minha amiga e maior incentivadora. Você mais do que ninguém sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado, me apoiando e me ouvindo com paciência, dizendo palavras sábias para me encorajar a ser forte e continuar lutando por meus objetivos. Saber que eu tenho você em minha vida traz acalento e felicidade ao coração. A mulher e profissional que eu sou hoje, dedico a você que não mediu esforços para que eu alcançasse minhas vitórias. A você todo o meu amor.

“Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade”.

Yoko Ono

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...

À minha orientadora Profa. Dra. Diana Gabriela Soares,

Obrigada por ser tão presente, companheira e por ter acreditado em meu potencial, me dando a oportunidade e privilégio de desenvolver grandes trabalhos ao seu lado.

*Você é exemplo de Professora e Pesquisadora competente e apaixonada pelo que faz, sendo inspiração para todos a sua volta. Sua paciência, dedicação e humildade em me ensinar e me guiar nas melhores decisões para concluirmos este trabalho com êxito, foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. A convivência com você me ensinou que ser forte, determinada e dedicada em nossa vida e trabalho, apenas nos faz colher bons frutos ao longo do caminho. A você
minha eterna gratidão.*

Ao querido Professor Carlos Alberto de Souza Costa,

*Obrigada por ter me aberto as portas de seu laboratório, contribuindo não somente para minha formação profissional, mas também acadêmica. Através de você tive a oportunidade de iniciar uma das mais incríveis jornadas da minha fase como pesquisadora. Agradeço em especial por ter confiado a mim a coordenação de seu laboratório e o desenvolvimento do trabalho de pesquisa no LPEB. Com você aprendi muito sobre a responsabilidade que temos para com a comunidade científica e com nossos colegas de laboratório no desenvolvimento de um trabalho sério e honesto. Seus ensinamentos são fundamentais em minha vida. A você toda a minha
admiração.*

Ao Prof. Dr. Marco Cícero Bottino,

Obrigada por sua receptividade e acolhimento durante meu período de Doutorado Sanduíche realizado em seu laboratório. Seu apoio, colaboração, direcionamento e entusiasmo com a pesquisa, possibilitou o desenvolvimento de um trabalho extraordinário e inovador. A oportunidade que tive de trabalhar com você e seu grupo de pesquisa, foram sem dúvida uma das maiores experiências da minha vida. Obrigada por sua contribuição tão importante em minha vida como pesquisadora.

AGRADECIMENTOS...

A minha família,

Que sempre estive ao meu lado, me trazendo bases sólidas para perseverar em meu caminho. Obrigada por estarem torcendo e vibrando comigo em cada passo e vitória alcançada. Sou muito feliz por ter todos vocês em minha vida.

Ao meu noivo Lucas,

Por cada gesto de carinho, amor e cuidado comigo. Independente da distância física que muitas vezes fomos submetidos, você sempre estive ao meu lado para me apoiar e me trazer de volta a segurança que por vezes se ausentava. Em você encontrei meu porto seguro. Obrigada por ser esse companheiro incrível, amigo e especial, que faz dos meus dias mais felizes quando estou ao seu lado. Todo o seu apoio foi imprescindível para que eu finalizasse esta etapa da minha vida. Te amo!

A minha amiga Fernanda Balestrero Cassiano,

Obrigada pela oportunidade de te ajudar e contribuir para sua orientação como aluna de Iniciação científica e por agora podermos trabalhar juntas e dividirmos nossas experiências na área profissional. Tê-la junto a mim nestes anos auxiliou no meu amadurecimento e desenvolvimento como pessoa e pesquisadora. Obrigada também por sua amizade e companheirismo. Conte sempre comigo.

A Profa. Dra. Josimeri Hebling,

Por seus importantes posicionamentos e contribuições científicas que me incitaram a ter uma reflexão crítica durante o desenvolvimento desta Tese de Doutorado. Me considero feliz por poder estar inserida no mesmo grupo de pesquisa desta exímia Pesquisadora. Obrigada por todo seu afeto e gentileza.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq,

Agradeço o apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Doutorado no período de Dezembro/2016 a Novembro/2017.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,

Pelo apoio financeiro essencial para realização desta pesquisa por meio da concessão da Bolsa de Doutorado no período de Dezembro/2017 a Janeiro/2021 (Processo n. 2017/20181-0) e pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior-BEPE (Processo n. 2018/14257-7). Agradeço também pelo Auxílio à Pesquisa - Jovem Pesquisador (Processo n. 2016/15674-5), ao qual este trabalho está vinculado e que custeou todas as despesas para realização desta pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp,

Representada pelo digníssimo Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia. Obrigada por desde a minha graduação terem feito da FOAr a minha casa. Todos estes anos nesta belíssima instituição trouxeram imenso aprendizado e crescimento. Meu muito obrigada!

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Representada pela coordenadora Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina e vice-coordenadora Profa. Dra. Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves. Gostaria de agradecer a vocês por todo apoio e auxílio sempre que necessário. Meu muito obrigada também a todos os professores do Programa, os quais foram essenciais para meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Representado pelo chefe Prof. Dr. Eduardo Colombari e vice-chefe Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, departamento no qual esta pesquisa foi desenvolvida.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Representado pelo responsável Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, cuja infraestrutura permitiu o desenvolvimento da maior parte das metodologias

empregadas nesta Tese de Doutorado, bem como meu desenvolvimento como pesquisadora.

Ao Assessor Renan César Palomino, do Escritório Regional de Apoio à Pesquisa e Internacionalização da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Muito obrigada por sempre ser tão solícito, atencioso e disposto em sanar dúvidas e resolver as questões burocráticas envolvidas com as bolsas e auxílios da FAPESP. Sua ajuda foi fundamental.

Aos secretários José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier, da Sessão Técnica de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Obrigada por serem tão prestativos em me atenderem e me ajudarem com muita atenção e dedicação.

À Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Pela sua colaboração em disponibilizar o microscópio de fluorescência para realização de parte das análises que compõem esta Tese de Doutorado.

Aos técnicos José Antônio Sampaio Zuanon e Juliana Pirola Garcia, do Laboratório de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Por todo apoio em várias etapas para execução dessa pesquisa, sempre com muita alegria, paciência e disposição. A ajuda de vocês foi de extrema importância!

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp,

Agradeço pelos dias de convivência, trocas de experiências e muito companheirismo proporcionados por meus colegas Maria Luísa de Alencar e Silva Leite, Carla Caroline de Oliveira Duque, Uxua Ortecho Zuta, Giovana Anovazzi, Taísa Pansani, Fernanda Basso, Igor Soares, Rafael Antônio e Lays Gomes. Obrigada por tudo.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo – USP,
Representada pelo digníssimo Diretor Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e pelo Vice-Diretor Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson. Obrigada por terem aberto a porta desta incrível Instituição para que eu pudesse finalizar junto com a minha orientadora este trabalho.

Ao Laboratório de Cultura de Células e Engenharia Tecidual, do Centro Integrado de Pesquisas 3, da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP,
Representado pela responsável Profa. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos, cuja organização da infraestrutura permitiu a finalização desta Tese de doutorado. Sem todo o seu apoio seria inviável a realização deste trabalho e a minha formação como pesquisadora.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células e Engenharia Tecidual, da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP,
Obrigada aos colegas de laboratório Fernanda Balestrero Cassiano, Marjorie de Oliveira Gallinari, Érika Bronze Uhle, Leandro Edgard Pacheco, Larissa Álamo e Camila Melo. A receptividade, alegria, amizade e leveza de vocês foram fundamentais para permitir a conclusão deste projeto. Obrigada pela convivência diária e momentos compartilhados. Vocês estão guardados em meu coração com muito carinho!

À todos,
Que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher”

Cora Coralina*

* Cora Coralina. Livro: Estrutura da língua latê, página 5. Autor: Geraldo Lapenda. Editora Universitária UFPE (278 páginas), 1965. ISBN-13: 978-8573152814.

Bordini EAF. Engenharia tecidual e biotecnologia aplicadas no desenvolvimento de scaffolds multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo empregar diferentes técnicas de engenharia tecidual e biotecnologia para o desenvolvimento de scaffolds biomiméticos em associação com moléculas com reconhecido potencial osteogênico, visando seu emprego em estratégias cell-homing para reparo do complexo dentina-polpa. A primeira estratégia foi baseada na formulação de scaffolds de quitosana (CH) contendo hidróxido de cálcio (Ca) e beta-glicerofosfato de sódio (β GP), sendo realizada sua caracterização físico-química (MEV, EDS, FTIR, perda de massa, grau de porosidade) e biológica in vitro (ensaios de contato direto e extrato). O potencial cell-homing foi testado em um modelo experimental pulp-in-a-chip, onde os scaffolds sem células foram cultivados justapostos a uma cultura 3D das células pulpares humanas sob pressão intra-pulpar simulada. Viabilidade celular (Alamar blue e Live/Dead), adesão/espalhamento (F-actina), migração celular (transwell), deposição cálcio/matriz mineralizada (o-cresolftaleína/Alizarin red), atividade de ALP (ensaio ponto final) e expressão de DSP (imunofluorescência) foram avaliados ($n=6$; ANOVA/Tukey; $\alpha=5\%$). A partir da incorporação de Ca e β GP em uma formulação específica foi possível desenvolver um scaffold poroso de quitosana contendo nanoglóbulos de cálcio e fosfato depositados sobre sua superfície (CH-Ca- β GP), com grau de degradabilidade controlada. Este scaffold permitiu adequada interação com as células pulpares semeadas sobre os mesmos, apresentando efeito bioestimulador sobre a viabilidade e expressão de marcadores de diferenciação odontogênica (ALP e mineralização), bem como foi capaz de modular a quimiotaxia e diferenciação celular à distância, de forma significativamente superior às demais formulações. Finalmente, o ensaio pulp-in-a-chip demonstrou seu potencial em mobilizar células da cultura 3D para sua superfície, e induzir a expressão de DSP e matriz mineralizada na ausência de suplementação osteogênica. A segunda estratégia foi baseada na formulação de um hidrogel fotopolimerizável de gelatina e metacrilato de metila (GelMA), ao qual foram adicionados nanotubos de haloisita (HNT) contendo dexametasona (DEX), criando-se um sistema de liberação controlada. Estes hidrogéis foram caracterizados quanto a morfologia (MEV), composição física e química (MET/FTIR), degradação enzimática e resistência compressiva. A avaliação biológica foi realizada por meio do contato direto com células pulpares humanas de dentes decíduos (SHEDs), e em modelo de co-cultura a distância com transwells sob estímulo inflamatório (LPS). Foram realizadas análises de viabilidade celular (MTS), atividade de ALP (AnaSpec) e deposição de matriz mineralizada (Alizarin red). A biocompatibilidade foi avaliada por teste de implantação em subcutâneo de ratos, e o potencial bioativo em defeitos críticos em calvária (ANOVA Two-way/Tukey; $\alpha=5\%$). Foi possível desenvolver um hidrogel macro-poroso com adequado módulo de compressão e degradabilidade, capaz de promover liberação controlada da DEX. As células semeadas sobre a superfície do GelMA contendo 5% de HNT-DEX 10% e em modelo de co-cultura sob estímulo inflamatório apresentaram os maiores valores de atividade de ALP e deposição de matriz mineralizada. Este biomaterial não promoveu reação inflamatória tecidual, e foi capaz de aumentar intensamente a deposição óssea in vivo. A partir dos

resultados obtidos, podemos concluir que ambos os sistemas desenvolvidos são promissores para aplicação na regeneração dentinária, pois são capazes de interagir positivamente com as células pulpares e estimulam a expressão do fenótipo odontoblástico in vitro e in vivo.

Palavras-Chave: Medicina Regenerativa. Engenharia Tecidual. Dentina.

Bordini EAF. Tissue engineering and biotechnology applied to the development of multifunctional scaffolds to stimulate pulp-dentin complex repair [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to apply tissue engineering and biotechnology techniques to develop biomimetic scaffolds in association with osteogenic molecules, as a cell-homing therapy for dentin regeneration. The first strategy was based on chitosan (CH) scaffolds containing calcium hydroxide (Ca) and beta-glycerophosphate (β GP). The scaffolds were subjected to physical-chemical (MEV, EDS, FTIR, degradation, porosity degree) and in vitro biological characterizations (direct contact and extract assay). Cell-homing potential was evaluated in a pulp-in-a-chip experimental model, in which cell-free scaffolds were cultivated in intimate contact with 3D cultures of dental pulp cells under simulated intra-pulpal pressure. Cell viability (Alamar blue and Live/Dead), adhesion/spread (F-actin), cell migration (transwell), calcium/mineralized matrix deposition (o-cresolftaleína/Alizarin red), ALP activity (end point assay) and DSP expression (immunofluorescence) were evaluated (n=6; ANOVA/Tukey; $\alpha=5\%$). The incorporation of Ca and β GP in a specific formulation created a stable porous chitosan scaffold containing calcium phosphate nano-globules on its surface (CH-Ca- β GP). This scaffold allowed adequate interaction with pulp cells and presented biostimulator effect on cell viability and odontogenic markers expression (ALP and mineralization) on cells seeded onto its surface and at distance, along with chemotactic potential. These cell effects were significantly higher than the other formulation. Finally, pulp-in-a-chip assay showed that CH-Ca- β GP mobilized cells from 3D culture to its surface, and induced DSP expression and mineralized matrix deposition in absence of osteogenic supplementation. In the second strategy, a photopolymerized hydrogel composed by gelatin and methyl metacrylate (GelMA) was associated with halloysite nanotubes (HNT) functionalized with dexamethasone (DEX), creating a drug delivery system. Hydrogel morphology (MEV), physical and chemical composition (MET, FTIR), enzymatic degradation and compressive strength were assessed. Biological analysis was performed by seeding stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) onto hydrogels, and by means of a co-culture model at distance using transwells under inflammatory stimulus (LPS). Cell viability (MTS), ALP activity (AnaSpec) and mineralized matrix deposition (Alizarin red) were determined. Hydrogel biocompatibility was evaluated after rat's subcutaneous implantation and the bioactive potential was investigated on critical calvarial defects (ANOVA Two-way/Tukey; $\alpha=5\%$). It was possible to create a porous hydrogel with adequate compressive modulus and degradability, capable to promote a controlled release of DEX. Cells seeded on GelMA surface containing 5% of HNT-DEX 10% and in co-culture model under inflammatory stimulus presented the highest values of ALP activity and mineralized matrix deposition. This biomaterial did not elicit inflammatory reaction and was capable to promote an intense increase on bone deposition in vivo. Based these results, it was possible conclude that both systems are promising for application in dentin regeneration, since they are capable to interact positively with pulp cells and also stimulate the odontoblastic phenotype expression in vitro and in vivo.

Keywords: Regenerative medicine. Tissue engineering. Dentin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 PROPOSIÇÃO.....	21
3 PUBLICAÇÕES.....	22
3.1 Publicação 1	22
3.2 Publicação 2	68
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE A – SUPPLEMENTARY INFORMATION (PUBLICAÇÃO 2)	111
ANEXO A – COMPROVANTE ARTIGO EM REVISÃO NA DENTAL MATERIALS	113
ANEXO B – COMPROVANTE ARTIGO EM REVISÃO NA ACTA BIOMATERIALIA	114
ANEXO C – COMPROVANTE ARTIGO PUBLICADO CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS.....	115

1 INTRODUÇÃO

Há vários anos, diversos pesquisadores têm trabalhado no sentido de tentar compreender e então modular o processo de regeneração tecidual através do desenvolvimento de biomateriais que se adaptem ao microambiente biológico ao qual é inserido, de forma a induzir uma resposta celular específica e otimizar o processo de reparo local¹⁻³. Assim, o emprego dos conceitos de Engenharia Tecidual e Biotecnologia têm apresentado amplo destaque dentro da Medicina e Odontologia contemporânea, sendo considerados como um campo multidisciplinar que integra princípios da ciência dos materiais, farmacologia, biologia celular e molecular, com o objetivo de solucionar problemas clínicos de forma mais efetiva⁴⁻⁶. Esta área de estudo baseia-se na interação de um biomaterial para atuar como substituto temporário da matriz extracelular (scaffold), células precursoras com potencial regenerativo e fatores biológicos para modulação da resposta celular⁷⁻¹⁰.

A formulação de scaffolds biocompatíveis e bioativos, capazes de induzir a quimiotaxia das células tronco residentes do tecido pulpar (DPCs) para o sítio de regeneração, seguido de diferenciação odontoblástica e deposição de matriz extracelular mineralizada, é de grande interesse para a regeneração da dentina em casos de exposição pulpar em uma estratégia denominada cell-homing¹¹⁻¹³. No capeamento pulpar direto (CPD), espera-se que a superfície do biomaterial em contato com a polpa participe efetivamente da formação de uma barreira de dentina por meio da indução do processo de regeneração tecidual mediado pelas DPCs. A estratégia cell-homing dentro da Engenharia Tecidual vem ganhando cada vez mais popularidade entre os pesquisadores devido aos aspectos éticos envolvidos, visto que esta terapia não envolve a implantação de células tronco em seres humanos, o que gera menor custo operacional e praticidade técnica, aproximando, assim, a experimentação laboratorial da aplicabilidade clínica^{3,11,14}. Para tanto, o biomaterial a ser empregado nesta terapia deve promover quatro fenômenos biológicos básicos: 1) induzir a quimiotaxia das células precursoras; 2) permitir sua adesão e proliferação; 3) induzir sua diferenciação; e 4) ativar sua atividade secretória, resultando na deposição do novo tecido^{11,15}.

O processo de adesão e proliferação das células precursoras sobre a estrutura dos scaffolds pode ser otimizado por meio do controle da arquitetura e composição química dos biomateriais^{16,17}. Dessa forma, os scaffolds formulados

devem apresentar composição química similar ao tecido alvo, e propriedades mecânicas adequadas, além de uma morfologia que estimule o espalhamento celular, com a consequente expressão de um fenótipo odontoblástico¹⁸⁻²⁰. O emprego de polímeros naturais, como a quitosana e gelatina, tem ganhado popularidade devido a melhor biocompatibilidade com os tecidos circundantes desde que a composição química é similar à matriz extracelular *in vivo*²¹⁻²³. A quitosana apresenta similaridade estrutural com as glicosaminoglicanas teciduais, o que proporciona integração com o tecido circundante, apresentando grupamentos amino e hidroxila que podem ser empregados para conjugação com drogas, fatores de crescimento e minerais de forma a aumentar sua bioatividade²⁴. Já a gelatina é composta por colágeno desnaturado, o principal componente da matriz extracelular do tecido pulpar. Assim, scaffolds a base de gelatina são ricos em sequências RGD (arginine-glycine-aspartic acid) aumentando as taxas de adesão e diferenciação celular^{23,25,26}.

A incorporação de fases minerais em scaffolds desenvolvidos para regeneração de tecidos mineralizados, tais como hidroxiapatita, beta-tri-calciofosfato, aluminato de cálcio, hidróxido de cálcio, dentre outros, aumenta a interação das células mesenquimais indiferenciadas com o substrato, devido à maior similaridade com a matriz extracelular natural, induzindo fortemente a expressão do fenótipo osteoblástico/odontoblástico, com consequente aumento na deposição de matriz mineralizada *in vitro* e *in vivo*^{20,21,27-32,33}. Outra estratégia que apresenta resultados promissores é a associação destas fases minerais com moléculas empregadas na suplementação osteogênica *in vitro*, como o ácido ascórbico (AA) e o beta-glicero-fosfato (β GP), com o objetivo de criar um scaffold biomimético capaz de promover um microambiente pró-osteogênese. Estudos prévios demonstraram que esta associação leva a um aumento na diferenciação osteo/odontogênica e na deposição óssea *in vivo*, tendo sido demonstrado que o β GP em associação com cálcio aumenta de forma intensa o potencial mineralizador de scaffolds sintéticos e naturais²⁴⁻³⁶. Assim, o β GP tem sido considerado como uma molécula bioativa dentro da engenharia de tecidos mineralizados, com baixo custo, elevada estabilidade e efeito bioativo similar aos fatores de crescimento empregados para esta proposta terapêutica³⁶.

Outra forma de apresentação dos scaffolds com grande aplicabilidade para regeneração dentinária são os hidrogéis fotoativados, devido a sua fácil

manipulação e possibilidade de injeção direta na área de defeitos pequenos e irregulares. Dentre estes hidrogéis, o metacrilato de gelatina (GelMA) apresenta estrutura tridimensional macro-porosa rica em colágeno e sequências RGD (arginina-glicina-aspartato), o que proporciona maior adesão, espalhamento e proliferação celular sobre a estrutura do biomaterial³⁷. Com a introdução de anidrido metacrílico à solução da gelatina, ocorre um aumento da estabilidade mecânica do hidrogel proporcionada por ligações moleculares insaturadas que se formam com os grupamentos amina livres presentes na molécula do polímero^{22,38,39}. Além disso, este hidrogel pode ser polimerizado após a adição de fotoiniciadores, que quando ativados por luz UV ou LED se decompõe e produzem radicais livres que se ligam aos grupos metacrilatos, tornando-os materiais tridimensionalmente estáveis a temperatura ambiente⁴⁰. Ainda, por ser um hidrogel composto por gelatina, quando submetido ao processo de hidrólise obtém-se como produto final o colágeno, principal componente da matriz extracelular da dentina⁴¹. Diversos estudos já demonstraram o potencial do GelMA como plataforma para proporcionar a regeneração óssea^{42,43}, do tecido pulpar^{44,45} e de tecidos mineralizados vascularizados^{37,46}.

Outra versatilidade dos hidrogéis é a possibilidade de criar sistemas de liberação controlada de drogas, a partir da incorporação de componentes bioativos durante o processo de formulação dos biomateriais^{37,42,45}. Assim, o uso de nanotubos torna-se promissor por estas estruturas proporcionarem um aumento na efetividade do sistema, devido à maior área de superfície, permitindo uma liberação lenta e gradual de baixas dosagens de drogas bioativas⁴⁷. Dentre estas estruturas, os nanotubos de haloisita (HNTs) são interessantes desde que são oriundos de uma fonte natural e biocompatível, a argila⁴⁸. Os HNTs são estruturas tubulares que ocorrem naturalmente, sendo formados internamente por lâminas de aluminossilicato de caulina, enroladas de 15 a 20 vezes gerando um diâmetro interno de cerca de 15 nm. Esta superfície interna constituída por alumina apresenta carga positiva, enquanto a superfície externa recoberta por sílica é carregada negativamente e apresenta diâmetros variando de 40-60 nm^{47,49}. Esta morfologia e composição dos HNTs possibilita o carregamento de drogas distintas, com diferentes características de carga⁵⁰. Devido ao seu comprimento (0.4-1.5 μm), suas partículas são facilmente dispersas em água ou polímeros polares, tornando-os um sistema altamente promissor para incorporação em hidrogéis, como o GelMA⁵¹.

De acordo com a literatura, quando usados como sistema de liberação de drogas, os HNTs apresentam a habilidade de proteger a droga contra a degradação por enzimas, e proporcionam um aumento no tempo de liberação⁴⁷. Diversos estudos já demonstraram que os HNTs não apresentam toxicidade sobre células humanas, apesar das mesmas serem capazes de penetrarem o ambiente intracelular. Além disso, esta característica se torna interessante por permitir o carregamento de drogas para o interior das células. A capacidade destas estruturas em promover a liberação de diversas drogas, aumentando a bioatividade de scaffolds já é bem consolidada na literatura^{47,52-54}.

Assim, surge o interesse em investigar o potencial dos HNTs funcionalizados com moléculas bioativas como uma estratégia para estimular a regeneração de tecidos mineralizados *in situ*. Dentro deste contexto, a dexametasona (DEX) apresenta-se como uma droga em potencial para regeneração de tecidos mineralizados, devido à mesma modular a expressão do fenótipo osteo/odontoblástico, promovendo aumento da deposição de matriz mineralizada⁵⁵⁻⁵⁸. A DEX é um corticosteroide sintético comumente utilizado no tratamento de condições inflamatórias, auxiliando no controle da dor e no direcionamento da resposta celular^{55,58,59}. Entretanto, a administração local da DEX em altas concentrações pode ocasionar efeitos tóxicos sobre as células, interferindo negativamente na neo-formação tecidual⁵⁵. Estudos prévios já demonstraram que é possível obter um padrão de liberação controlada da DEX por meio de sua incorporação no interior dos HNTs⁶⁰; desta forma, o emprego desta tecnologia em combinação com GelMA surge como uma estratégia altamente interessante para a regeneração dentinária em casos de exposição pulpar.

Diante do exposto, o presente projeto de pesquisa propôs a aplicação de diferentes tecnologias no campo da engenharia tecidual para obter scaffolds bioativos com potencial para regeneração dentinária. Duas propostas foram abordadas visando a regeneração dentinária: (1) desenvolvimento de um scaffold poroso de quitosana em associação com hidróxido de cálcio e beta-glicerofosfato; e (2) formulação de um hidrogel fotopolimerizável de GelMA contendo um sistema de liberação controlada de dexametasona à base de HNTs. Desta forma, esta Tese de Doutorado será dividida em dois capítulos, de forma a abordar separadamente as duas estratégias desenvolvidas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os tratamentos tradicionalmente empregados no cenário clínico para manutenção da vitalidade pulpar envolvem a aplicação de cimentos à base de hidróxido de cálcio, que são conhecidos por seus efeitos tóxicos sobre as células da polpa dental humana (DPCs), induzindo necrose de coagulação associado à inflamação no tecido circundante, retardando o processo de reparo do tecido pulpar.

As técnicas empregadas na Engenharia tecidual permitem o desenvolvimento de scaffolds bioativos com diferentes formulações e topografias de superfície, as quais interferem diretamente no processo de reparo tecidual dentro de um contexto minimamente invasivo. Estes biomateriais buscam otimizar a resposta celular criando um microambiente similar ao da matriz extracelular do tecido alvo que foi perdido, com o intuito de promover alta biocompatibilidade para as interações celulares, favorecendo seu crescimento.

Scaffold poroso de quitosana contendo em sua composição cálcio e solução de beta-glicerofosfato de sódio favorece a proliferação celular e diferenciação odontogênica para DPCs semeadas em contato direto sobre sua estrutura, além de apresentar potencial bioativo a distância sobre as células. Resultados promissores desta formulação, para aplicação em terapias cell-homing foram obtidos quando empregado o modelo de *pulp-in-a-chip*, demonstrando o potencial quimiotático destes scaffolds em estimular a migração de células para sua estrutura, com consequente diferenciação odontogênica determinada pela deposição de matriz rica em cálcio e expressão de DSP.

O desenvolvimento do hidrogel a base de metacrilato de gelatina (GelMA), contendo em sua composição 5% de nanotubos de haloisita carregados com dexametasona 10%, demonstrou excelente potencial bioativo e odontogênico sobre células pulpare humanas de dentes decíduos (SHEDs). A partir da composição deste hidrogel multifuncional foi possível estimular a deposição de matriz mineralizada mesmo em ambiente celular sob estímulo inflamatório. Esta formulação apresentou potencial promissor para aplicação em terapias cell-homing em estratégias de regeneração/reparo dentinário por aumentar consideravelmente a formação óssea em defeitos críticos de calvária, além de apresentar reação inflamatória tecidual mínima.

REFERÊNCIAS*

1. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater.* 2012; 28(1): 23-40.
2. Motamedian SR, Hosseinpour S, Ahsaie MG, Khojasteh A. Smart scaffolds in bone tissue engineering: a systematic review of literature. *World J Stem Cells.* 2015; 7(3): 657-68.
3. 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; 166: 180-6.
4. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(2): 184-98.
5. Pearson RG, Bhandari R, Quirk RA, Shakesheff KM. Recent advances in tissue engineering, *J Long Term Eff Med Implants.* 2017; 27(2-4): 199-231.
6. Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review. *Adv Mater Sci Eng.* 2019; 2019: 1-13.
7. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res.* 2012; 91(3): 227-34.
8. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater.* 2012; 28(4): 341-8.
9. Costello BJ, Kumta P, Sfeir CS. Regenerative technologies for craniomaxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 73(12 Suppl): S116-25.
10. Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis.* 2016; 3(1): 56-71.
11. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod.* 2014; 40(4 Suppl): S41-5.
12. Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS. Photobiomodulation of dental derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *Photomed Laser Surg.* 2016; 34(11): 500-8.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Soares DG, Zhang Z, Mohamed F, Eyster TW, de Souza Costa CA, Ma PX. Simvastatin and nanofibrous poly(l-lactic acid) scaffolds to promote the odontogenic potential of dental pulp cells in an inflammatory environment. *Acta Biomater.* 2018a; 68: 190-203.
14. Piva E, Silva AF, Nör JE. Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod.* 2014; 40(4 Suppl): S33-40.
15. Moura-Netto C, Ferreira LS, Maranduba CM, Mello-Moura ACV, Marques MM. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): S1806-83242016000100265.
16. Bertassoni LE. Progress and challenges in microengineering the dental pulp vascular microenvironment. *J Endod.* 2020; 46(9S): S90-S100.
17. Ha M, Athirasala A, Tahayeri A, Menezes PP, Bertassoni LE. Micropatterned hydrogels and cell alignment enhance the odontogenic potential of stem cells from apical papilla in-vitro. *Dent Mater.* 2020; 36(1): 88-96.
18. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod.* 2005; 31(10): 711-8.
19. Shah D, Lynd T, Ho D, Chen J, Vines J, Jung HD, Kim JH, Zhang P, Wu H, Jun HW, Cheon K. Pulp-dentin tissue healing response: a discussion of current biomedical approaches. *J Clin Med.* 2020; 9(2): 434.
20. Soares DG, Bordini EAF, Cassiano FB, Bronze-Uhle ES, Pacheco LE, Zabeo G, Hebling J, Lisboa-Filho PN, Bottino MC, de Souza Costa CA. Characterization of novel calcium hydroxide-mediated highly porous chitosan-calcium scaffolds for potential application in dentin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020; 108(6): 2546-59.
21. Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Costa CA. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): e54.
22. Swetha S, Lavanya K, Sruthi R, Selvamurugan N. An insight into cell-laden 3D-printed constructs for bone tissue engineering. *J Mater Chem B.* 2020; 8(43): 9836-62.
23. Xin T, Mao J, Liu L, Tang J, Wu L, Yu X, Gu Y, Cui W, Chen L. Programmed sustained release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and inorganic ion composite hydrogel as artificial periosteum. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020; 12(6): 6840-51.
24. Hu D, Lian Z, Xian H, Jiang R, Wang N, Weng Y, Peng X, Wang S, Ouyang X. Adsorption of Pb(II) from aqueous solution by polyacrylic acid grafted magnetic chitosan nanocomposite. *Int J Biol Macromol.* 2020; 154: 1537-47.

25. Pan J, Deng J, Yu L, Wang Y, Zhang W, Han X, Camargo PHC, Wang J, Liu Y. Investigating the repair of alveolar bone defects by gelatin methacrylate hydrogels-encapsulated human periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2019; 31(1): 3.
26. Kim Y, Lee D, Song D, Kim H, Kim S. Biocompatibility and bioactivity of set direct pulp capping materials on human dental pulp stem cells. *Materials (Basel)*. 2020; 13(18): 3925.
27. Xu HH, Zhao L, Weir MD. Stem cell-calcium phosphate constructs for bone engineering. *J Dent Res*. 2010; 89(12): 1482-8.
28. Liu H, Peng H, Wu Y, Zhang C, Cai Y, Xu G, Li Q, Chen X, Ji J, Zhang Y, OuYang HW. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials*. 2013; 34(18): 4404-17.
29. Wang P, Zhao L, Chen W, Liu X, Weir MD, Xu HH. Stem cells and calcium phosphate cement scaffolds for bone regeneration. *J Dent Res*. 2014; 93(7): 618-25.
30. Emamgholi A, Rahimi M, Kaka G, Sadraie SH, Najafi S. Presentation of a novel model of chitosan- polyethylene oxide-nanohydroxyapatite nanofibers together with bone marrow stromal cells to repair and improve minor bone defects. *Iran J Basic Med Sci*. 2015; 18(9): 887-93.
31. Roy P, Sailaja RR. Chitosan-nanohydroxyapatite composites: mechanical, thermal and bio-compatibility studies. *Int J Biol Macromol*. 2015; 73: 170-81.
32. Shalumon KT, Lai GJ, Chen CH, Chen JP. Modulation of bone-specific tissue regeneration by incorporating bone morphogenetic protein and controlling the shell thickness of silk fibroin/chitosan/nanohydroxyapatite core-shell nanofibrous membranes. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7(38): 21170-81.
33. Bordini EAF, Cassiano FB, Silva ISP, Usberti FR, Anovazzi G, Pacheco LE, Pansani TN, Leite ML, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Synergistic potential of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and calcium-aluminate-chitosan scaffolds with dental pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2020; 24(2): 663-74.
34. Hosseini FS, Enderami SE, Hadian A, Abazari MF, Ardeshiryajimi A, Saburi E, Soleimanifar F, Nazemisalman B. Efficient osteogenic differentiation of the dental pulp stem cells on β -glycerophosphate loaded polycaprolactone/polyethylene oxide blend nanofibers. *J Cell Physiol*. 2019; 234(8): 13951-58.
35. He Y, Li Q, Ma C, Xie D, Li L, Zhao Y, Shan D, Chomos SK, Dong C, Tierney JW, Sun L, Lu D, Gui L, Yang J. Development of osteopromotive poly (octamethylene citrate glycerophosphate) for enhanced bone regeneration. *Acta Biomater*. 2019; 93: 180-91.

36. Li D, Zhang K, Shi C, Liu L, Yan G, Liu C, Zhou Y, Hu Y, Sun H, Yang B. Small molecules modified biomimetic gelatin/hydroxyapatite nanofibers constructing an ideal osteogenic microenvironment with significantly enhanced cranial bone formation. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 7167-81.
37. Smith EE, Zhang W, Schiele NR, Khademhosseini A, Kuo CK, Yelick PC. Developing a biomimetic tooth bud model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(12): 3326-36.
38. Sun H, Tang J, Mou Y, Zhou J, Qu L, Duval K, Huang Z, Lin N, Dai R, Liang C, Chen Z, Tang L, Tian F. Carbon nanotube-composite hydrogels promote intercalated disc assembly in engineered cardiac tissues through β 1-integrin mediated FAK and RhoA pathway. *Acta Biomater*. 2017; 48: 88-99.
39. Rajabi N, Kharaziha M, Emadi R, Zarrabi A, Mokhtari H, Salehi S. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/gelatin methacrylate/Laponite® as a potential surgical sealant. *J Colloid Interface Sci*. 2020; 564: 155-69.
40. Dong Z, Yuan Q, Huang K, Xu W, Liu G, Gu Z. Gelatin methacryloyl (GelMA)-based biomaterials for bone regeneration. *RSC Adv*. 2019; 31: 17737-44.
41. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015; 73: 254-71.
42. Chen X, Bai S, Li B, Liu H, Wu G, Liu S, Zhao Y. Fabrication of gelatin methacrylate/nanohydroxyapatite microgel arrays for periodontal tissue regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 4707-18.
43. Qiao Y, Liu X, Zhou X, Zhang H, Zhang W, Xiao W, Pan G, Cui W, Santos HA, Shi Q. Gelatin templated polypeptide co-cross-linked hydrogel for bone regeneration. *Adv Health Mater*. 2020; 9(1): e1901239.
44. Monteiro N, Smith EE, Angstadt S, Zhang W, Khademhosseini A, Yelick PC. Dental cell sheet biomimetic tooth bud model. *Biomaterials*. 2016; 106: 167-79.
45. Ha M, Athirasala A, Tahayeri A, Menezes PP, Bertassoni LE. Micropatterned hydrogels and cell alignment enhance the odontogenic potential of stem cells from apical papilla in-vitro. *Dent Mater*. 2020; 36(1): 88-96.
46. Visser J, Gawlitta D, Benders KE, Toma SM, Poursan B, van Weeren PR, Dhert WJ, Malda J. Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. *Biomaterials*. 2015; 37: 174-82.
47. Santos AC, Ferreira C, Veiga F, Ribeiro AJ, Panchal A, Lvov Y, Agarwal A. Halloysite clay nanotubes for life sciences applications: From drug encapsulation to bioscaffold. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018; 257: 58-70.
48. Lvov Y, Wang W, Zhang L, Fakhrullin R. Halloysite clay nanotubes for loading and sustained release of functional compounds. *Adv Mater*. 2016; 28(6): 1227-50.

49. Kurczewska J, Pecyna P, Ratajczak M, Gajęcka M, Schroeder G. Halloysite nanotubes as carriers of vancomycin in alginate-based wound dressing. *Saudi Pharm J*. 2017; 25(6): 911-20.
50. Satish S, Tharmavaram M, Rawtani D. Halloysite nanotubes as a nature's boon for biomedical applications. *Nanobiomedicine (Rij)*. 2019; 6: 1849543519863625.
51. Cunha DA, Rodrigues NS, Souza LC, Lomonaco D, Rodrigues FP, Degrazia FW, Collares FM, Sauro S, Saboia VPA. Physicochemical and microbiological assessment of an experimental composite doped with triclosan-loaded halloysite nanotubes. *Materials (Basel)*. 2018; 11(7): 1080.
52. Massaro M, Buscemi G, Arista L, Biddeci G, Cavallaro G, D'Anna F, Di Blasi F, Ferrante A, Lazzara G, Rizzo C, Spinelli G, Ullrich T, Riela S. Multifunctional carrier based on halloysite/laponite hybrid hydrogel for kartogenin delivery. *ACS Med Chem Lett*. 2018; 10(4): 419-24.
53. Yamina AM, Fizir M, Itatahine A, He H, Dramou P. Preparation of multifunctional PEG-graft-halloysite nanotubes for controlled drug release, tumor cell targeting, and bio-imaging. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018; 170: 322-9.
54. Jamshidzadeh F, Mohebalı A, Abdouss M. Three-ply biocompatible pH-responsive nanocarriers based on HNT sandwiched by chitosan/pectin layers for controlled release of phenytoin sodium. *Int J Biol Macromol*. 2020; 150: 336-43.
55. Lim HC, Nam OH, Kim MJ, El-Fiqi A, Yun HM, Lee YM, Jin GZ, Lee HH, Kim HW, Kim EC. Delivery of dexamethasone from bioactive nanofiber matrices stimulates odontogenesis of human dental pulp cells through integrin/BMP/mTOR signaling pathways. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 2557-67.
56. Moretti RDC, Duailibi MT, Martins PO, dos Santos JA, Duailibi SE. Osteoinductive effects of preoperative dexamethasone in human dental pulp stem cells primary culture. *Future Sci OA*. 2017; 3(3): FSO184.
57. Chuang YC, Yu Y, Wei MT, Chang CC, Ricotta V, Feng KC, Wang L, Bherwani AK, Ou-Yang HD, Simon M, Zhang L, Rafailovich M. Regulating substrate mechanics to achieve odontogenic differentiation for dental pulp stem cells on TiO₂ filled and unfilled polyisoprene. *Acta Biomater*. 2019; 89: 60-72.
58. Zhang M, Ni S, Zhang X, Lu J, Gao S, Yang Y, Wang Z, Sun H, Li Y. Dexamethasone-loaded hollow hydroxyapatite microsphere promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells in vitro. *Odontology*. 2020; 108(2): 222-30.
59. van den Heuvel SAS, van der Wal SEI, Bronkhorst EM, Warlé MC, Ronday M, Plat J, van Alfen N, Joosten LAB, Lerou JGC, Vissers KCP, Steegers MAH. Acute cytokine response during breast cancer surgery: potential role of dexamethasone and lidocaine and relationship with postoperative pain and complications - analysis of three pooled pilot randomized controlled trials. *J Pain Res*. 2020; 13: 1243-54.

60. Veerabadran NG, Goli PL, Stewart-Clark SS, Lvov YM, Mills DK. Nanoencapsulation of stem cells within polyelectrolyte multilayer shells. *Macromol Biosci.* 2007; 7(7): 877-82.